



HAL
open science

Les communautés bactériennes d'environnements radioactifs naturels et anthropisés : discrimination des facteurs environnementaux les structurant et caractérisation des mécanismes d'interaction d'isolats indigènes avec l'uranium

Guillaume Holub

► **To cite this version:**

Guillaume Holub. Les communautés bactériennes d'environnements radioactifs naturels et anthropisés : discrimination des facteurs environnementaux les structurant et caractérisation des mécanismes d'interaction d'isolats indigènes avec l'uranium. Autre. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0150 . tel-04217974

HAL Id: tel-04217974

<https://theses.hal.science/tel-04217974>

Submitted on 26 Sep 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR
DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES CHIMIQUES
Spécialité Chimie Analytique et Environnementale

Par **Guillaume HOLUB**

**Les communautés bactériennes d'environnements radioactifs
naturels et anthropisés : discrimination des facteurs
environnementaux les structurant et caractérisation des
mécanismes d'interaction d'isolats indigènes avec l'uranium**

Sous la direction de : Claire SERGEANT
Co-directrice : Clarisse MALLET

Soutenue le 19 juin 2023 devant la commission d'examen formée de :

M. PESCE, Stéphane	Directeur de Recherche, INRAE, Lyon	Président
Mme. LAUGA, Béatrice	Professeure, Université de Pau et des Pays de l'Adour	Rapporteuse
M. MERROUN, Mohamed	Professeur, Université de Grenade	Rapporteur
M. INCERTI, Sébastien	Directeur de Recherche, CNRS, Bordeaux	Examineur
Mme. SERGEANT, Claire	Chargée de Recherche, CNRS, Bordeaux	Directrice
Mme. MALLET, Clarisse	Maitre de Conférence, Université Clermont Auvergne	Co-Directrice
M. BRETON, Vincent	Directeur de Recherche, CNRS, Clermont-Ferrand	Invité

Remerciements

Me voici en train d'écrire ces dernières lignes de ma thèse, réalisant à quel point ces années de thèse ont été enrichissantes pour moi, que ce soit d'un point de vue scientifique mais également personnel, grâce aux nombreuses rencontres et rebondissements survenus durant ces années. Ce fut une super aventure ! Je ne peux malheureusement pas résumer en quelques lignes toute la gratitude que j'éprouve envers toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à l'obtention de mon doctorat, mais sachez que je vous en suis très reconnaissant à tous.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Mme. Béatrice Lauga, M. Mohamed Merroun, M. Stéphane Pesce, M. Sébastien Incerti et M. Vincent Breton, d'avoir accepté d'évaluer mon travail, pour le temps et l'attention que vous avez consacrés à la lecture du manuscrit, ainsi que pour les échanges constructifs et pertinents que nous avons eus lors de ma soutenance de thèse. Je remercie également le directeur du laboratoire du LP2IB, Fabrice Piquemal, de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions.

Je souhaite ensuite remercier très chaleureusement mes directrices de thèses, Claire et Clarisse, pour leur encadrement, leur gentillesse et leur soutien dans mes travaux de thèse. Claire, je te remercie tout d'abord de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre en thèse après mon stage de M2, sur un sujet passionnant où je n'ai pas vu le temps passer. Merci pour ton soutien quotidien jusqu'au dernier jour, que ce soit dans mon travail, lors de ma rédaction ou pour avoir toujours fait en sorte que je travaille dans les meilleures conditions malgré toutes les galères qu'on a eues. Et surtout, je te remercie très sincèrement de m'avoir fait confiance durant ces années. Clarisse, bien qu'éloignés géographiquement, j'ai beaucoup apprécié les nombreuses discussions très enrichissantes que nous avons pu avoir durant ces années de thèse, qui m'ont permis de grandement m'améliorer dans mon travail. Ces années ont été une super expérience et ce fut un très grand plaisir de travailler avec vous. Vous m'avez permis de travailler dans des conditions très saines et pour cela et tant d'autres, je vous remercie !

Je remercie les membres du groupe RADEN, en particulier mes collègues du groupe « Raden-microbio », Marie-Hélène et Adam pour leur sympathie et leur bonne humeur quotidienne. Marie-Hélène, j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi au quotidien, tu as toujours été prête à me donner un coup de main et toujours disponible pour discuter de sciences, ou autres sujets, dans les bons comme dans les mauvais moments, je te remercie pour tout ça et bien d'autres choses ! Adam, je te remercie pour les très nombreux conseils que tu m'as donnés

pour faire avancer mon projet, ce qui m'a permis de gagner en maturité scientifique, mais également pour ton amitié. Un très grand merci pour tous ce que vous m'avez transmis, vous m'avez grandement aidé durant ces années.

Je remercie également les membres de « Raden-gaz rare », Bernard, Denis, Bertrand, Rémi, Éric et Jocelyn. J'ai beaucoup apprécié les nombreux échanges que nous avons eus, qu'il s'agisse de sujets scientifiques ou d'autres, ainsi que de votre soutien lors des derniers mois de rédaction.

Je remercie ensuite tous les membres du LP2IB, pour leur accueil et leur bienveillance au quotidien. Ce fut pour moi toujours un plaisir de venir travailler au laboratoire, et ceci, c'est en majeure partie grâce à vous. En particulier, un très grand merci aux thésards et postdoc, Vincent, Xalbat, Pierre B, Antoine, Julien, Axel, Aurora, Arnaud, Pierre C, Audric, pour les nombreux moments partagés (et les squats effectués). Je vous souhaite à tous plein de bonheur pour le futur !!!

Merci également à mes collègues des collaborations TIRAMISU et INSPECT, pour les nombreux échanges que nous avons eus qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux de thèse. Je remercie également Mme. Sabrina Lacomme et M. Etienne Gontier du BIC à Bordeaux pour leur collaboration, et leur aide dans mon projet.

Enfin, je souhaite remercier mes amis, Rémy, Jon, Stéphane, Florent, Thomas, Guillaume, pour tous ces moments passés ensemble durant ces années, qui m'ont permis de me changer les idées. Vous avez été d'un réel soutien, merci !

Victoria, ton soutien, ta gentillesse et ton aide quotidienne m'ont permis de garder le sourire, même dans les moments les plus difficiles. Tu as su me faire aller de l'avant et me donner toute la motivation nécessaire pour réussir à finir cette thèse. Pour cela et bien plus encore, muchas gracias por compartir mi vida.

Pour finir, je souhaite adresser un immense merci à mes parents et mon frère, pour leur soutien permanent depuis toujours et pour avoir toujours cru en moi. Retourner à la maison durant toutes ces années a toujours été un immense plaisir où j'ai pu me ressourcer. Je vous remercie pour tous ce que vous m'avez apporté. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous, je suis très chanceux de vous avoir.

Sommaire

Remerciements	3
Liste des figures	9
Liste des tableaux	15
Introduction	17
Chapitre 1 : Etat de l'art.....	21
Partie A : L'uranium	22
I- L'uranium : Généralités	22
1) De sa découverte à son utilisation	22
2) Propriétés chimiques et radioactives	23
II- Origine de l'uranium	25
III- Spéciation et comportement de l'uranium en milieux naturels.....	27
IV- Toxicité de l'uranium	29
Partie B : Impact de la radioactivité sur les bactéries	31
I- Généralités sur les bactéries	31
II- Les bactéries peuplant les milieux extrêmes	34
III- Radiorésistance des bactéries	35
IV- Impact de l'uranium sur les communautés bactériennes.....	36
Partie C : Rôle des bactéries dans la spéciation (mobilité) de l'uranium	39
I- Biosorption	40
II- Bioaccumulation.....	42
III- Biominéralisation	43
IV- Bioréduction	45
V- Bioremédiation de l'uranium dans l'environnement.....	46
Partie D : Objectifs de la thèse.....	47
Chapitre 2 : Sites de prélèvement et Méthodes.....	49
I- Description des sites d'études	50
1) Sources minérales radioactives dans le Massif Central en Auvergne	50
a) Description des sources minérales.....	50
b) Echantillonnage des sources minérales	54
c) Caractérisation physico-chimique des sources minérales échantillonnées.....	54
2) Ancien site minier de Rophin.....	59
a) Description du site et des projets associés.....	59

b)	Echantillonnage de carottes de sol dans la zone humide à l'aval du site de Rophin	64
c)	Caractérisation physico-chimique des carottes de sol échantillonnées	66
II-	Analyses des communautés bactériennes par métabarcoding.....	69
1)	Extraction de l'ADN et vérification de l'ADN par électrophorèse.....	70
2)	Amplification du gène de l'ARNr 16S par PCR et séquençage.....	71
3)	Assignment taxonomique et analyse des données.....	72
III-	Isolement et identification des souches bactériennes.....	74
1)	Isolement de souches bactériennes.....	74
a)	Ensemencement des échantillons d'eau des sources minérales.....	74
b)	Ensemencement des échantillons de sol de la carotte de Rophin.....	75
c)	Isolement des souches bactériennes et conservation	76
2)	Identification des souches bactériennes isolées	76
a)	Extraction de l'ADN génomique.....	76
b)	Amplification par PCR du gène de l'ARNr16S des souches isolées	77
c)	Séquençage et identification des souches bactériennes isolées	77
d)	Analyses phylogénétiques	78
IV-	Exposition des bactéries à l'uranium	78
1)	Cultures pour l'étude de la résistance de souches bactériennes à l'uranium	78
2)	Etude des mécanismes d'interaction entre les bactéries et l'uranium.....	80
a)	Exposition des bactéries à l'uranium dans une solution de NaCl (0,9%).....	80
b)	Exposition des bactéries à l'uranium dans une solution de MOPS + β -glycérophosphate.....	81
3)	Etude de la capacité d'élimination de l'uranium dans une eau de rivière par un isolat indigène	82
V-	Analyses chimiques par spectrophotométrie.....	82
1)	Principe.....	82
2)	Mesure de l'uranium	84
3)	Dosage des orthophosphates (PO_4^{3-}).....	86
VI-	Observation des cellules bactériennes exposées à l'uranium par microscopie électronique en transmission	88
1)	Principe de la méthode	88
2)	Préparation des échantillons.....	92
3)	Acquisition des images.....	93
VII-	Méthodes statistiques	94
Chapitre 3 :	Etude des communautés bactériennes de sources minérales naturellement radioactives	97
I-	Contexte général et objectifs	98

II- Caractérisation des profils physico-chimiques et bactériens des sources minérales naturellement radioactives échantillonnées.....	100
1) Profils physico-chimiques des sources étudiées.....	100
2) Composition et diversité des communautés bactériennes dans les échantillons de sédiments de sources minérales.....	106
a) Pré-filtrage de la table d'OTUs	106
b) Mesure des indices de diversité alpha	108
c) Analyse taxonomique des communautés bactériennes des sédiments de sources minérales	111
3) Relation entre les différents paramètres environnementaux et les communautés bactériennes dans les sédiments de sources minérales.....	114
a) Identification des OTUs discriminant ces sources	114
b) Corrélation entre ces OTUs spécifiques et les paramètres physico-chimiques de ces sources.....	120
4) Evolution des communautés au cours des saisons	129
III- Conclusion.....	133
Chapitre 4 : Etude des communautés bactériennes du sol d'une zone humide contaminée en uranium	135
I- Contexte général et objectifs	136
II- Discrimination des communautés bactériennes édaphiques d'une zone humide contaminée en uranium	138
1) Analyse de la composition et diversité des communautés bactériennes des différents profils de sols échantillonnés	138
a) Pré-filtrage de la table d'OTUs	138
b) Mesure des indices de diversité alpha	139
c) Composition taxonomique des populations bactériennes des profils de sol échantillonnés.....	141
2) Effets des paramètres physico-chimiques sur les communautés bactériennes.	144
a) Identification des OTUs discriminant ces couches de sol	144
b) Corrélation entre ces OTUs spécifiques et les paramètres physico-chimiques des couches de sol	148
III- Conclusion.....	151
Chapitre 5 : Caractérisation des mécanismes d'interaction entre des isolats indigènes et l'uranium	153
I- Contexte général et objectifs	154
II- Isolement de souches bactériennes des sources minérales naturellement radioactives	155
1) Isolement et identification des souches isolées dans les sources minérales.....	156
2) Souches isolées potentiellement tolérantes aux radioéléments/métaux	157

III- Sélection de bactéries potentiellement radiorésistantes et interagissant avec l'uranium	165
IV- Résistance des souches bactériennes à l'uranium	174
1) Solubilité de l'uranium dans le milieu de culture utilisé pour ces expériences	174
2) Sélection des souches mises en présence d'uranium	176
3) Croissance des souches bactériennes en présence d'uranium	178
V- Caractérisation des mécanismes d'interaction entre les bactéries et l'uranium	183
1) Exposition des bactéries à l'uranium dans une solution NaCl	183
2) Exploration du potentiel de biominéralisation de l'uranium des souches O19 GR ND1 2 (<i>Shewanella sp.</i>) et A17 12 -22 (<i>Serratia fonticola</i>)	193
a) Conditions expérimentales	193
b) Elimination de l'uranium par la souche O19 GR ND1 2	198
c) Elimination de l'uranium par la souche A17 12 -22	201
VI- Expérience préliminaire de bioremédiation à l'aide de la souche A17 12 -22.....	206
VII- Conclusion.....	209
Conclusion générale et Perspectives	211
1) Conclusion générale	211
2) Perspectives	213
Bibliographie.....	215
Annexes.....	244
Annexe 1 : Composition des milieux de cultures utilisés pour la culture bactérienne.....	244
1) Composition du milieu de culture Tryptic Soja Broth (TSB)	244
2) Composition du milieu Luria-Bertani (LB)	244
3) Composition du milieu « Freshwater Minimal Medium » (FMM).....	245
Annexe 2 : Corrélation entre les OTUs spécifiques et les paramètres physicochimiques dans la carotte de Rophin (2020).....	247
Annexe 3 : Isolement de souches bactériennes provenant d'une carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin	248
1) Isolement et identification des bactéries provenant des différents horizons de sols échantillonnés	248
2) Souches isolées potentiellement tolérantes aux radioéléments/métaux	256
Annexe 4 : Arbres phylogénétiques des souches isolées dans les sources minérales	260
Communications scientifiques	269

Liste des figures

Figure 1 : Chaîne de désintégration de l'uranium 238 (IRSN)	24
Figure 2 : Spéciation prédite (répartition en %) de U en fonction du pH (4,5 à 9,5) pour une eau douce modèle à (a) 0,3 µg/l et (b) 30 µg/l sans substances humiques (Markich, 2002)	28
Figure 3 : Schéma de la structure cellulaire d'une cellule bactérienne	32
Figure 4 : Mécanisme d'interaction entre bactéries et uranium conduisant à une immobilisation de l'uranium dans l'environnement (d'après Kolhe et al., 2018)	39
Figure 5 : Observation en microscopie électronique en transmission de la localisation de l'uranium (a) à la surface des cellules de <i>Bacillus sphaericus</i> JG-A12 (Merroun et al., 2005).....	41
Figure 6 : Observation en microscopie électronique en transmission de la localisation de l'uranium (c et d) à l'intérieur des cellules de <i>Bacillus sp. dwc-2</i> (Li et al., 2014).....	43
Figure 7 : Observation en microscopie électronique en transmission de la localisation de l'uranium (flèche rouge) dans l'espace extracellulaire des cellules de <i>Serratia sp. strain OT II 7</i> (Chandwadkar et al., 2018)	44
Figure 8 : Observation en microscopie électronique à balayage de la localisation de précipités d'uraninite à la surface des cellules de <i>Shewanella putrefaciens</i> (Abdelouas et al., 1998)	45
Figure 9 : Localisation géographique des 7 sources minérales sélectionnées (Bard, Gravier, Dourieux, Montagne, Mariol, 3 Sauts et Salins) dans le Massif Central (Auvergne)	52
Figure 10 : Photos des 7 sources échantillonnées dans le Massif Central (Auvergne, France) en octobre 2019 et juin 2020 : a) Gravier; b) Bard; c) Mariol; d) Dourieux; e) Salins; f) Montagne; g) 3 Sauts	53
Figure 11 : a) Localisation du site de Rophin ; b) Vue d'ensemble du bassin versant de Rophin en 1954 avec les différentes extractions de gisement d'uranium à proximité ;c) Chronologie des opérations de la mine de Rophin (Martin et al., 2020)	59
Figure 12 : Vue d'ensemble du bassin versant du Rophin en 2018, avec les emplacements des points de mesure des relevés gamma, de la zone humide à l'aval du site minier, des installations minières en 1954 et du site de stockage des résidus miniers (ICPE) (Martin et al., 2020).	61
Figure 13 : Carte et photos des différents points échantillonnés dans le ruisseau « le Gourgeat » situé à l'aval de l'ancien site minier d'uranium de Rophin	62
Figure 14 : Carte positionnant dans le bassin versant (du cours d'eau : Le Gourgeat) la zone humide de Rophin (en jaune), l'activité minière passée (en vert) et la zone actuelle de stockage de stériles miniers (en noir), avec des débits de dose gamma interpolés	63
Figure 15 : Carotte de sol de 50cm prélevée en septembre 2020 dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin à l'aide d'un carottier russe placé directement dans une boîte à gants portable sous atmosphère d'azote (Crédit : Mireille Del Nero, IPHC).	64
Figure 16 : Log stratigraphique des différentes couches du profil de sol de la carotte prélevée dans la zone humide en septembre 2020 (Crédit : Mireille Del Nero, Olivier Courson, IPHC).....	65
Figure 17: Répartition des échantillons prélevés dans la carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin, en juin 2021 (Crédit photo : Olivier Courson, IPHC).....	66

Figure 18 : Analyse d'un gel par le logiciel Image Lab Software™ (Bio-Rad): a) Révélation au BET d'un gel d'agarose par exposition aux rayonnements U.V ; b) Profil de ligne obtenu pour la 1ère bande; c) Courbe de régression du marqueur de taille	71
Figure 19: Culture bactérienne par dilution en série de l'échantillon d'eau de la source de Gravier, duplicata 1, après 10 jours d'incubation à 25°C (recto/verso des boites de Pétri)	75
Figure 20: Culture bactérienne par dilution en série de l'échantillon de la couche MH dans le milieu TSB (réplica 1) après 5 jours de croissance à 25°C	75
Figure 21: Schéma d'une courbe de croissance bactérienne en milieu non renouvelé. 1) Phase de latence 2) Phase exponentielle 3) Phase stationnaire 4) Phase de déclin	80
Figure 22 : Schéma de principe d'un spectrophotomètre UV-visible mono faisceau (d'après Piard, 2021).....	84
Figure 23 : Formule semi-développée du Bromo-PADAP (2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diéthylaminophenol), (Johnson & Florence 1971).....	85
Figure 24 : Schéma du protocole pour la préparation des échantillons pour la mesure de l'uranium par spectrophotométrie	86
Figure 25 : Schéma du protocole pour la préparation des échantillons pour la mesure des ions orthophosphate inorganique par spectrophotométrie.....	88
Figure 26 : Schéma des différents processus d'interaction électron-matière et leur lien avec les différentes techniques MET (Kociak, 2007)	89
Figure 27 : Schéma du principe de fonctionnement d'un MET (Kociak, 2007)	90
Figure 28 : Exemple d'un spectre EDS d'une coupe de cellules bactériennes exposées à l'uranium (Voir chapitre 5).....	91
Figure 29 : Exemple d'une carte élémentaire d'une coupe de cellules bactériennes exposées à l'uranium (Voir chapitre 5)	91
Figure 30: Histogramme de la contribution (en %) de chaque paramètre physico-chimique aux composantes 1 et 2	101
Figure 31 : Analyse en composantes principales (ACP) montrant la distribution des sources échantillonnées en octobre 2019 et juin 2020 (sauf pour 3 sauts : pas de données pour juin 2020) en fonction des 23 variables physico-chimiques qui contribuent le plus à expliquer cette distribution	102
Figure 32 : Courbes de raréfaction des OTUs bactériennes pré-filtrées pour chaque échantillon, a) Lors de la campagne de 2019; b) Lors de la campagne de 2020	107
Figure 33 : Comparaison des indices de diversité : a) de Shannon ; b) de Chao1 entre les 5 sources étudiées pour la campagne d'octobre 2019 visualisés en boxplots. Les sources ayant des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$	109
Figure 34: Comparaison des indices de diversité : a) de Shannon; b) de Chao1 entre les 5 sources étudiées pour la campagne de juin 2020 visualisés en boxplots. Les sources ayant des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$	109
Figure 35 : Abondance relative des phylums majoritaires obtenus lors des campagnes d'octobre 2019 et juin 2020	111

Figure 36: Abondance relative (exprimée en % du nombre total de lecture d'OTUs) des bactéries, a) des phylums; b) des ordres majeurs pour la campagne 2019 et c) des phylums d) des ordres majeurs, pour la campagne 2020. Ordres mineurs = ordre représentant <0,5% de la totalité des séquences obtenues pour chaque campagne	113
Figure 37: Répartition des échantillons des sources de la campagne de 2019 due aux OTUs prédominantes dans chacune d'entre elles, provenant de l'analyse sPLS-DA sur les deux premières composantes avec des tracés d'ellipses au niveau de confiance de 95%	115
Figure 38: Carte d'images groupées (heatmap) représentant l'abondance relative des OTUs sélectionnées dans chaque échantillon par sPLS-DA sur les données pré-filtrées des OTUs à partir des deux premières composantes en octobre 2019	116
Figure 39: Répartition des échantillons des sources de la campagne de 2020 due aux OTUs prédominant dans chacune d'entre elles, provenant de l'analyse sPLS-DA sur les deux premières composantes avec des tracés d'ellipses au niveau de confiance de 95 %	117
Figure 40 : Carte d'images groupées (heatmap) représentant l'abondance relative des OTUs sélectionnées dans chaque échantillon par sPLS-DA sur les données pré-filtrées des OTUs à partir des deux premières composantes en juin 2020.....	119
Figure 41: Cercle de corrélation de l'analyse sPLS mettant en évidence les relations entre les OTU spécifiques et les paramètres physico-chimiques des sources en octobre 2019	121
Figure 42: Cercle de corrélation de l'analyse sPLS mettant en évidence les relations entre les OTU spécifiques et les paramètres physico-chimiques des sources en juin 2020.....	122
Figure 43 : Schéma représentant les associations complémentaires possibles entre les différents OTUs associées aux fortes concentrations en radioéléments, dont l'uranium, dans les sédiments des sources de Montagne et Dourieux. Les flèches représentent les relations commensales ou mutualistes entre ces différentes espèces	128
Figure 44: Comparaison des indices de diversité de Shannon et de Chao1 entre les deux saisons (octobre 2019 et juin 2020) pour chaque source visualisée en boxplots. Les différences significatives obtenues par une comparaison des moyennes par t-test entre les deux saisons sont indiquées par un * si $p < 0,05$	129
Figure 45: Projection des échantillons des sources, en Octobre 2019 et Juin 2020, dans l'espace défini par les composantes moyennes du jeu de données des OTUs et du jeu de données des paramètres physico-chimiques, avec des tracés d'ellipses au niveau de confiance de 95 %.....	131
Figure 46: Graphique du cercle de corrélation de l'analyse sPLS mettant en évidence les OTUs et les paramètres physico-chimiques expliquant la répartition des échantillons des sources lors des deux saisons étudiées	131
Figure 47: Courbe de raréfaction des OTUs bactériennes préfiltrées des échantillons de la carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de la mine de Rophin.....	139
Figure 48: Comparaison des indices de diversité : a) de Shannon; b) de Chao1; entre les 3 profils de sols échantillonnés dans la carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier d'uranium	

de Rophin par une ANOVA (n=3). Les profils ayant des lettres différentes sont significativement différents à pvalue < 0,05 (test post hoc de Tukey).....	140
Figure 49 : Histogramme de l'abondance relative (exprimée en % du nombre total de lecture d'OTUs) de chaque phylum obtenu dans les 3 profils de sols échantillonnés en 2020	141
Figure 50 : Histogramme de l'abondance relative (exprimée en % du nombre total de lecture d'OTUs) des ordres majeurs obtenus dans les 3 profils de sols échantillonnés en 2020. Ordre mineur = ordre représentant <0,5% de la totalité des séquences obtenues dans la carotte	142
Figure 51: Répartition des échantillons des 3 profils de sol de la carotte de 2020, due aux OTUs prédominantes dans chacune d'entre elles, provenant de l'analyse sPLS-DA sur les deux premières composantes avec des tracés d'ellipses au niveau de confiance de 95%.....	144
Figure 52 : Carte d'images groupées (heatmap) représentant l'abondance relative des OTUs sélectionnées dans chaque échantillon par sPLS-DA sur les données pré-filtrées des OTUs à partir des deux premières composantes pour les échantillons de sol de la carotte de Rophin	145
Figure 53: Cercle de corrélation de l'analyse sPLS mettant en évidence les relations entre les OTUs spécifiques et les paramètres physicochimiques de chaque couche de sol de la carotte de Rophin (2020).	148
Figure 54: a) Nombre de souches isolées et nombre d'OTUs obtenues dans chaque source; b) Abondance relative (%) de chaque phylum obtenue pour chaque échantillon d'eau de source minérale étudié.....	156
Figure 55: Arbre phylogénétique des souches présélectionnées pour étudier leur résistance et interaction avec l'uranium	169
Figure 56: Mécanisme d'interaction entre l'uranium et la souche <i>Shewanella oneidensis</i> strain MR-1(Shen et Fein, 2014).....	173
Figure 57 : Taux de croissance des différentes souches étudiées dans chaque milieu de culture (FMM + β -glycerophosphate et (FMM +trimetaphosphate) en présence de 100 μ M de nitrate d'uranyle après 70 heures d'incubation à 30°C.....	179
Figure 58: Pourcentage d'élimination de l'uranium dans les milieux de culture (FMM + β -glycerophosphate et FMM +trimetaphosphate) par les différentes souches bactériennes après 30 jours de culture dans les 2 milieux	179
Figure 59: Spéciation théorique de l'uranium à 100 μ M dans une solution de NaCl (0,9%) en fonction du pH (Modélisation Visual MINTEQ 3.1)	184
Figure 60 : Pourcentage d'élimination d'uranium (%) par rapport au contrôle : a) des 3 souches isolées des sources minérales (+ témoins cellules tuées); b) des 3 souches isolées du site de Rophin (+ témoins cellules tuées), dans une solution de NaCl (0,9%) avec 100 μ M de nitrate d'uranyle à pH 4 sur 24 heures	186
Figure 61: Analyse par microscopie à transmission des cellules de O19 GR ND1 2 (<i>Shewanella sp.</i> strain A16OP11) en présence de 100 μ M de nitrate d'uranyle dans une solution de NaCl (0,9%) à pH 4. Images de (A) Cellules témoin non exposées à l'uranium observées par traitement conventionnel ; (B) Cellules témoin non exposées à l'uranium observées par coloration négative ; (C) Cellules exposées à l'uranium observées par traitement conventionnel ; (D) Cellules exposées à l'uranium observées par coloration négative	189

Figure 62 : Analyse par microscopie à transmission des cellules de A17 12 -22 (<i>Serratia fonticola</i> strain N36-2-3-2) en présence de 100µM de nitrate d'uranyle dans une solution de NaCl (0,9%) à pH 4. Images de (A) Cellules témoin non exposées à l'uranium observées par traitement conventionnel ; (B) Cellules témoin non exposées à l'uranium observées par coloration négative ; (C) Cellules exposées à l'uranium observées par traitement conventionnel ; (D) Cellules exposées à l'uranium observées par coloration négative....	190
Figure 63 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM dans une solution de MOPS (20mM) + β-glycérophosphate (5mM) en fonction du pH (Modélisation Visual MINTEQ 3.1).....	195
Figure 64 : Pourcentage d'élimination d'uranium par rapport au contrôle des souches O19 GR ND1 2 (<i>Shewanella</i> sp. strain A16OP11) et A17 12 -22 (<i>Serratia fonticola</i> strain N36-2-3-2) (+ témoins cellules tuées) dans une solution de MOPS (20mM) + β-glycérophosphate (5mM) avec 1mM de nitrate d'uranyle à pH 7 sur 3 jours	197
Figure 65 : Concentration en orthophosphate (PO_4^{3-}) pour les souches O19 GR ND1 2 (<i>Shewanella</i> sp. strain A16OP11) et A17 12 -22 (<i>Serratia fonticola</i> strain N36-2-3-2) (+ témoins cellules tuées et témoin sans uranium) dans une solution de MOPS (20mM) + β-glycérophosphate (5mM) avec 1mM de nitrate d'uranyle à pH 7 sur 3 jours.....	198
Figure 66 : Observation par microscopie électronique à transmission (en STEM-HAADF) de cellules d'O19 GR ND1 2 déposées directement sur la grille de carbone après 3 jours en présence de 1mM de nitrate d'uranyle	199
Figure 67 : Observation par microscopie électronique à transmission (en STEM-HAADF) a) d'une cellule zoomée d'O19 GR ND1 2 déposés directement sur la grille de carbone après 3 jours en présence de 1mM de nitrate d'uranyle. Cartes de distribution par X-EDS b) de l'uranium (en jaune) et du phosphore (en vert), c) de l'uranium, d) du phosphore.....	200
Figure 68 : Observation par microscopie électronique à transmission (en STEM-HAADF) a) de cellules d'A17 12 -22 déposées directement sur la grille de carbone après 3 jours en présence de 1mM de nitrate d'uranyle. Cartes de distribution par X-EDS b) de l'uranium (en jaune) et du phosphore (en vert), c) de l'uranium, d) du phosphore.	203
Figure 69 : Micrographie par STEM-HAADF d'une section mince a) de cellules d'A17 12 -22 après 3 jours en présence de 1mM de nitrate d'uranyle et b) d'une cellule zoomée. Cartes de distribution de la cellule zoomée par X-EDS c) de l'uranium (en jaune), d) du phosphore (en blanc).	204
Figure 70 : Pourcentage d'élimination d'uranium (en rouge) et concentration en PO_4^{3-} (en bleu) mesurées dans l'eau prélevée du site de Rophin après exposition des cellules d'A17 12 -22 à 1mM de nitrate d'uranyle en présence de β-glycérophosphate à pH 7 pendant 4 jours.....	207
Figure 71 : Heatmap de la sPLS réalisée sur les données d'OTUs spécifiques et des paramètres physicochimiques de la carotte prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin en 2020	247
Figure 72: a) Nombre de souches isolées et nombre d'OTUs obtenues dans chaque couche de sol; b) Abondance relative (%) de chaque phylum obtenu pour chaque horizon de sol échantillonné.....	249
Figure 73 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche MO à partir du milieu LB : <i>Firmicutes</i>	250

Figure 74 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche MO à partir du milieu LB : <i>Proteobacteria</i> et <i>Bacteroidetes</i>	251
Figure 75 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche MO à partir du milieu TSB	252
Figure 76 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche ZB à partir du milieu LB	253
Figure 77 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche ZB à partir du milieu TSB	254
Figure 78 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche MH à partir du milieu LB	255
Figure 79 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche MH à partir du milieu TSB	256
Figure 80 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Graviers	260
Figure 81 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Bard	261
Figure 82 : Arbre phylogénétique des souches isolées de Mariol.....	262
Figure 83 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Dourieux : <i>Proteobacteria</i>	263
Figure 84 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Dourieux : <i>Firmicutes</i> et <i>Actinobacteria</i>	264
Figure 85 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Dourieux : <i>Bacteroidetes</i>	264
Figure 86 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Montagne.....	265
Figure 87 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de 3 Sauts.....	266
Figure 88 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Salins : <i>Proteobacteria</i>	267
Figure 89 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Salins : <i>Firmicutes</i> & <i>Bacteroidetes</i> ..	268

Liste des tableaux

Tableau 1: Abondance naturelle, période radioactive et activité massique des principaux isotopes de l'uranium (d'après IRSN, 2010)	24
Tableau 2 : Synthèse bibliographique des recherches menées sur les communautés bactériennes provenant de sites contaminés en uranium	37
Tableau 3 : Exemples de bactéries étudiées pour leur capacité à interagir avec l'uranium	40
Tableau 4 : Concentrations en COT (g(C)/Kg), en CHNS totale (g/kg), en métaux traces ($\mu\text{g/g}$ excepté pour Fe en mg/g), ainsi que l'activité des radioéléments (en Bq/g) mesurée dans les échantillons de sédiments pour chaque site lors des campagnes d'octobre 2019 et juin 2020	56
Tableau 5 : Variables physico-chimiques (conductivité, température, oxygène dissous, pH, ions majeurs, métaux traces et radioéléments) mesurées dans les échantillons d'eaux pour chaque site lors des campagnes d'octobre 2019 et juin 2020	57
Tableau 6: Principaux paramètres physico-chimiques mesurés dans l'eau des sources échantillonnées en octobre 2019. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type ($n=3$). LD = Limite de détection ; / = mesure non effectuée	58
Tableau 7 : Concentrations en éléments traces (en $\mu\text{g/g}$) et éléments majeurs (%) dans chaque couche de la carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin en septembre 2020	67
Tableau 8: Concentrations en As, Cr, Cu, Pb, Th, U et Zn (en $\mu\text{g/g}$) dans chaque couche de la carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin en juin 2021	68
Tableau 9 : Cycles d'amplification appliqués au cours des réactions de PCR	72
Tableau 10 : Nombre d'OTUs observées, ainsi que les indices de diversité alpha mesurés (Chao1 = richesse et Shannon = diversité), dans les échantillons de sédiments des sources échantillonnées en octobre 2019 et juin 2020. Pour les indices de diversité, les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type ($n=3$).	108
Tableau 11 : Nombre d'OTUs observées, ainsi que les indices de diversité alpha mesurés (Chao1 = richesse et Shannon = diversité), dans les échantillons de sol des différentes couches de la carotte de Rophin. Pour les indices de diversité, les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type ($n=3$)	139
Tableau 12 : OTUs spécifiques pour chaque couche de sol et leur affiliation obtenues à partir de l'analyse sPLS-DA	146
Tableau 13 : Synthèse bibliographique des souches isolées des sources minérales associées à des espèces bactériennes connues pour tolérer et/ou interagir avec des métaux et/ou des radioéléments	158
Tableau 14: Liste des souches bactériennes présélectionnées pour étude de leur résistance et interaction avec l'uranium	166
Tableau 15 : Concentrations d'uranium mesurées après 4 jours dans les milieux FMM + β -glycérophosphate et FMM + sodium trimetaphosphate contenant 100, 500 ou 1000 μM de nitrate d'uranyle	175

Tableau 16: Croissance des souches bactériennes préselectionnées dans les milieux FMM + β -glycérophosphate et FMM + Trimetaphosphate. Vert = Croissance, Jaune = Faible croissance, Rouge = pas de croissance	177
Tableau 17: Tableau récapitulatif résumant les résultats obtenus pour les souches isolées du site de Rophin	180
Tableau 18: Tableau récapitulatif résumant les résultats obtenus pour les souches isolées des sources minérales naturellement radioactives	181
Tableau 19 : Mesure de la concentration en uranium (μM) par spectrophotométrie à t1h et t24h d'une solution de NaCl (0,9%) contenant 100 μM de nitrate d'uranyle à pH 4	185
Tableau 20 : Synthèse bibliographique des conditions expérimentales d'études traitant de la biominéralisation de l'uranium par différentes souches bactériennes	194
Tableau 21 : Mesure de la concentration en uranium (μM) par spectrophotométrie à t1j, t2j et t3j d'une solution de MOPS (20mM) + β -glycérophosphate (5mM) contenant 1mM de nitrate d'uranyle à pH 7	196
Tableau 22 : Composition du milieu Tryptic Soja Broth par litre d'eau	244
Tableau 23 : Composition du milieu Luria-Bertani par litre d'eau	244
Tableau 24 : Composition du milieu Freshwater minimal medium (FMM) par litre d'eau	245
Tableau 25 : Solution Oligo-éléments	245
Tableau 26 : Solution vitamines	246
Tableau 27 : Synthèse bibliographique des souches isolées de la carotte associées à des espèces bactériennes connues pour tolérer et/ou interagir avec des métaux et/ou des radioéléments	257

Introduction

La radioactivité est un phénomène physique naturel par lequel des atomes instables se transforment spontanément en d'autres atomes (désintégration) en émettant des particules et de l'énergie. Ces atomes, qui possèdent la propriété de se transformer spontanément en d'autres éléments, en émettant de l'énergie sous forme de rayonnements, sont appelés « radionucléides ». Chaque matrice environnementale, que ce soit l'eau, l'air, les sols, les roches ou les milieux vivants, présente une certaine radioactivité naturelle. Ce bruit de fond provient de radionucléides à longue durée de vie apparus lors de la formation de la Terre, dont en particulier l'uranium 238, le thorium 232 et l'uranium 235, présents naturellement dans la croûte terrestre à des concentrations plus ou moins importantes. Ces radionucléides, de périodes radioactives (ou temps de demi-vie) très longues (4,5 milliards, 14 milliards et 700 millions d'années respectivement), vont produire, par désintégration radioactive spontanée, des descendants qui sont pour la plupart radioactifs, tels que le radium 226, le radon 222 et le polonium 210. Ainsi la radioactivité présente naturellement sur Terre est non seulement due à la présence d'uranium et de thorium, mais également à tous leurs descendants radioactifs.

Certains environnements sur Terre sont caractérisés par des niveaux de radiation naturellement élevés, désignés sous l'acronyme NORM (Naturally Occuring Radioactive Materials). En effet, bien que l'uranium soit globalement présent à l'état de traces, avec une concentration médiane dans les sols estimée à environ 2 mg/kg (De Vos et al., 2006), sa concentration peut varier considérablement en fonction de la géologie locale et des processus géochimiques qui ont eu lieu au fil du temps. En France, les concentrations les plus élevées se trouvent dans le Massif Central (Auvergne, France), dont le socle rocheux est principalement constitué de granite riche en uranium. En particulier, le Massif Central est caractérisé par la présence de sources minérales présentant des niveaux de radioactivité naturelle élevés (NORM). Les radioéléments présents dans ces sources proviennent principalement de l'altération chimique des roches granitiques riches en uranium de cette région par les eaux souterraines, qui vont se charger en ^{238}U et ^{235}U , ainsi que leurs descendants radioactifs. Par conséquent, en raison de leurs niveaux de minéralisation importants, mais également des niveaux de radioactivité élevés, ces sources présentent des caractéristiques particulières pour la biodiversité qui y vit.

D'autre part, les fortes concentrations en uranium observées dans le Massif Central ont entraîné l'exploitation de gisements d'uranium dans cette région. Cette exploitation minière,

principalement entre les années 1950 et 2000, ont entraîné la production de nombreux résidus et stériles miniers qui ont été stockés principalement sous la forme de terrils. C'est le cas de l'ancien site minier de Rophin (Lachaux, Puy-de-Dôme, France) qui, de nos jours, a été réhabilité en site de stockage de résidus miniers de traitements de minerais d'uranium classé ICPE (Installations Classées Protection de l'Environnement). Par conséquent, ce site de stockage est un milieu présentant des niveaux de radioactivité naturelle renforcés par des activités humaines, désigné sous l'acronyme TENORM (Technologically Enhanced Naturally Occurring Radioactive Materials). De plus, il a été démontré que les environnements situés à l'aval de sites de stockage, dont des zones humides, présentent également des concentrations en radioéléments naturels élevées par rapport au fond géochimique dû aux activités minières. L'étude de ce site, et des environnements avoisinant, présente donc un fort intérêt, d'autant plus qu'il n'a pas été remodelé depuis sa formation dans les années 50, et présente aujourd'hui une faune et une flore exposées à de faibles doses chroniques depuis plusieurs décennies.

La présence de ces radioéléments dans l'environnement, qu'ils soient d'origine naturelle dans les sources minérales (NORM) ou renforcée par des activités humaines dans le cadre de l'ancien site minier d'uranium de Rophin (TENORM), peut avoir une influence sur la biodiversité peuplant ces environnements. Dans ce contexte la Zone Atelier Territoires Uranifères (ZATU), membre du réseau des zones ateliers (ZA), labellisé par l'INEE (Institut écologie et environnement du CNRS) en 2015, développe une démarche pluridisciplinaire afin d'étudier le rôle de la radioactivité sur l'apparition, l'évolution et l'adaptation du vivant à ce stress environnemental. En particulier, l'étude des communautés microbiennes, dont les bactéries, exposées à des radiations à long terme dans ces environnements, offre une occasion unique de comprendre comment elles se sont adaptées à ces stress induits par des niveaux élevés de radiations.

Les bactéries, premiers êtres vivants à être apparus sur Terre (Djokic et al., 2017 ; Dodd et al., 2017), sont omniprésents et vivent naturellement en communautés complexes qui interagissent entre elles : échange de nutriments, compétition pour les substrats, production de composés chimiques. Grâce à leurs capacités métaboliques variées, les bactéries peuplent de nombreux habitats, y compris les plus extrêmes, dont des environnements caractérisés par des niveaux de rayonnement élevés (Gupta et al., 2014). Les communautés bactériennes qui rencontrent régulièrement des niveaux élevés de rayonnements ionisants sont soumises à des pressions de sélection, donnant lieu à des populations radiotolérantes dans de tels sites (Chandwadkar et al., 2018 ; Shuryak, 2019). Diverses stratégies sont adoptées par les bactéries

pour soutenir leur croissance et leur survie dans des environnements enrichis en uranium, incluant des mécanismes tels que la bioréduction, la biominéralisation, la biosorption et la bioaccumulation, entraînant dans certains cas une modification de la spéciation des radioéléments, les rendant moins mobiles, moins biodisponibles et donc moins toxiques.

Les sources minérales radioactives sont des écosystèmes où les rayonnements ionisants pourraient constituer un driver abiotique influençant la diversité et la structuration des communautés microbiennes. En effet, les communautés bactériennes peuplant ces sources sont exposées à des niveaux élevés de radioactivité naturelle et chronique à très long terme. Il apparaît donc intéressant d'étudier les communautés bactériennes qui colonisent ces sources, afin de mettre en évidence si des communautés spécifiques sont identifiées et liées aux concentrations en radioéléments dans ces sources. En parallèle, dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin, les communautés bactériennes sont exposées à de fortes concentrations en radionucléides depuis un laps de temps plus court. En conséquence, les radionucléides pourraient affecter les fonctions des communautés microbiennes et donc influencer les fonctions écologiques des zones humides. De plus, les communautés bactériennes du sol de cette zone humide pourraient interagir directement ou indirectement avec les radionucléides et/ou leur environnement, et participer aux processus de transfert et migration de ces éléments dans cet environnement. Il apparaît donc également intéressant d'observer si dans cette zone humide, des populations bactériennes sont spécifiques aux fortes concentrations en radioéléments mesurées pouvant intervenir dans les processus de spéciation et de mobilité de l'uranium.

Ce travail de thèse, qui s'inscrit dans le cadre de la ZATU, a pour objectif principal de caractériser les communautés bactériennes présentes dans les sources minérales naturellement radioactives (NORM), ainsi que dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier d'uranium de Rophin (TENORM), afin d'étudier si la radioactivité d'origine naturelle et renforcée par des activités humaines influence et structure les communautés bactériennes présentes dans ces deux environnements. L'analyse de ces communautés a été réalisée par métabarcoding, en complément de la caractérisation des paramètres physicochimiques, afin de déterminer si les radionucléides, par rapport à d'autres paramètres environnementaux, sont des « drivers » de la composition des communautés bactériennes. En outre, les mécanismes d'interaction avec l'uranium, mis en place par des isolats indigènes dans ces deux sites, ont été évalués, afin de déterminer l'effet de ces bactéries sur la mobilité et biodisponibilité de cet élément dans l'environnement.

Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique qui décrit le contexte de ce travail en présentant les connaissances actuelles sur la géochimie de l'uranium dans l'environnement, son impact sur les communautés bactériennes et le rôle de ces communautés dans la spéciation de l'uranium.

Le second chapitre débute par une présentation des sites d'études échantillonnés, suivi d'une description des différentes démarches expérimentales réalisées pour caractériser les communautés bactériennes présentes dans ces deux sites, ainsi que les différents protocoles expérimentaux mise en œuvre pour étudier les interactions bactéries-uranium.

Le troisième chapitre présente les travaux sur l'étude des communautés bactérienne des sources minérales naturellement radioactives situées en Auvergne échantillonnées en octobre 2019 et juin 2020. Ces travaux ont permis, dans un premier temps, de définir les profils physico-chimiques de 5 sources minérales. Dans un deuxième temps, les communautés bactériennes présentes dans les sédiments de ces sources minérales ont été caractérisées afin d'observer si ces communautés sont différentes entre ces 5 sources, et si les radionucléides, comparés aux autres paramètres physicochimiques, sont des « drivers » de la composition des communautés bactériennes. Enfin, l'évolution des communautés bactériennes dans ces sources minérales est discutée.

Le quatrième chapitre est dédié à la caractérisation des communautés bactériennes présentes dans une carotte de sol prélevée dans une zone humide à l'aval de l'ancien site minier d'uranium de Rophin. Cette zone humide étant caractérisée par un horizon de sol défini par de fortes concentrations en radioéléments, il a été recherché s'il existe des populations bactériennes tolérantes et/ou résistantes pouvant intervenir dans les processus de spéciation et de migration de radioéléments, dont en particulier l'uranium.

Enfin le cinquième chapitre est axé sur l'étude des mécanismes d'interaction mis en place par des isolats indigènes des sources minérales et de l'ancien site minier de Rophin. Parmi les différentes souches isolées, celles connues dans la littérature pour leur radiotolérance et/ou leur capacité à interagir avec l'uranium et/ou des métaux y sont présentées. En complément, certaines de ces souches bactériennes ont été mises en contact avec de l'uranium afin d'étudier leur résistance et leur capacité à interagir avec cet élément. Leur capacité à éliminer l'uranium en solution et les mécanismes d'interaction potentiels mis en place par ces souches avec l'uranium y sont discutés.

Chapitre 1 :Etat de l'art

Partie A : L'uranium

I- L'uranium : Généralités

1) De sa découverte à son utilisation

L'uranium a été découvert en 1789 par un chimiste prussien, Martin Heinrich Klaproth, célèbre pour sa découverte de plusieurs éléments chimiques dont l'uranium, le zirconium, et le chrome. Il découvrit l'uranium sous forme d'oxyde à partir de l'analyse d'une roche, la pechblende, contenant majoritairement de l' U_3O_8 . Il proposa tout d'abord le nom d'*urane* pour ce nouveau composé identifié, en référence à la découverte de la planète Uranus par William Herschel en 1781. Ce n'est qu'en 1841 que le chimiste français Eugène-Melchior Péligot, démontra que l'urane n'était pas un métal pur mais du dioxyde d'uranium. Par la suite, il réussit à produire de l'uranium pur en réduisant le tétrachlorure d'uranium (UCl_4) avec du potassium métallique. Il estima alors la masse volumique de l'uranium à $19g/cm^3$.

Un siècle plus tard, le physicien français Henri Becquerel découvrit la radioactivité de l'uranium, en 1896, lorsqu'il constata que des plaques photographiques avaient été noircies par des rayonnements émis par des sels d'uranium placés à proximité de ces plaques. La découverte de la radioactivité naturelle par Henry Becquerel peut être considérée comme le point de départ de l'industrie des minerais radioactifs. De nombreux chercheurs vont se lancer dans l'étude et la compréhension de la radioactivité comme Pierre et Marie Curie qui vont découvrir deux nouveaux éléments naturellement radioactifs, le polonium et le radium en 1898. Au départ, l'uranium est considéré comme un sous-produit du radium et son utilisation est limitée à la coloration des verres, céramiques ou porcelaine.

Ce n'est qu'à partir de la Seconde Guerre mondiale, où des progrès majeurs en physique nucléaire permettent de constater que les atomes d'uranium peuvent être fissionnés pour libérer une grande quantité d'énergie. A partir de cette période, l'uranium suscita un fort intérêt pour divers pays dont la France, que ce soit pour son utilisation militaire ou dans le civil pour la production d'électricité. En conséquence, de nombreuses mines furent ouvertes en France ou à l'étranger pour son exploitation. Ces nouvelles applications de l'uranium ont permis de développer et approfondir les connaissances sur les propriétés chimiques et physiques de cet élément.

2) Propriétés chimiques et radioactives

L'uranium, de symbole U, est le dernier élément naturel du tableau périodique de Mendeleïev. C'est un métal gris, très dense (sa masse volumique étant de $19,05 \text{ g/cm}^3$), de numéro atomique $Z=92$, appartenant à la famille des actinides. Un atome d'uranium possède 92 protons et entre 125 et 150 neutrons. L'uranium est l'élément le plus lourd (atome possédant le plus de nucléons) présent naturellement sur Terre. L'uranium a un comportement similaire aux autres éléments du groupe (VI) du tableau périodique (Zavodska et al., 2008). Sous forme élémentaire, c'est une substance très réactive et forme des composés avec la plupart des éléments chimiques. Naturellement dans l'environnement, l'uranium n'existe pas sous forme chimiquement pur ou en alliage. En effet, en raison de sa forte électropositivité, il se caractérise par une forte affinité pour l'oxygène et se trouve donc sous forme de composés oxygénés dans l'environnement. C'est un élément facilement oxydable, qui dans l'air, se couvre d'une couche d'oxyde. Ainsi, dans la nature, l'uranium se présente principalement sous forme oxydée (Zavodska et al., 2008). La configuration électronique de l'uranium est la suivante : $[\text{Rn}] 5f^3 6d^1 7s^2$, possédant donc 6 électrons de valence.

L'uranium est également un métal naturellement radioactif, présent dans les minéraux et les roches sédimentaires. L'uranium possède différents isotopes, tous radioactifs, dont les trois isotopes naturellement présents sont : ^{234}U , ^{235}U et ^{238}U , les autres isotopes étant produits artificiellement. L'uranium 238 et 235 sont les plus abondants sur Terre et sont présents depuis son origine. L' ^{234}U est, quant à lui, présent à l'état naturel comme l'un des produits de désintégration de l' ^{238}U (Grenthe et al., 2006). En revanche, il est plus radioactif que les 2 autres isotopes naturels de l'uranium, et contribue environ pour la moitié de la radioactivité totale de l'uranium naturel (IRSN 2010). La répartition naturelle de ces trois isotopes dans un minerai d'uranium est de 99,27% pour l' ^{238}U , 0,719% pour l' ^{235}U et 0,0057% pour l' ^{234}U (IRSN, 2010). Le Tableau 1 ci-dessous résume l'abondance, l'activité et la période des principaux isotopes de l'uranium.

Tableau 1: Abondance naturelle, période radioactive et activité massique des principaux isotopes de l'uranium (d'après IRSN, 2010)

Isotope	^{232}U	^{233}U	^{234}U	^{235}U	^{236}U	^{238}U
Abondance naturelle (% en masse)	-	-	0,0057	0,719	-	99,275
Période radioactive (année)	69,8	$1,6 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$7,04 \times 10^8$	$2,37 \times 10^7$	$4,47 \times 10^9$
Activité massique (Bq/g)	$8,14 \times 10^{11}$	$3,56 \times 10^8$	$2,30 \times 10^8$	$8,00 \times 10^4$	$2,36 \times 10^6$	$1,24 \times 10^4$

Les isotopes de l'uranium se désintègrent principalement par émission de rayonnements alpha et possèdent des périodes très longues. Chacun de ces éléments émet un rayonnement libérant de l'énergie lors de ses désintégrations radioactives spontanées et produit des descendants, qui sont pour la plupart également radioactifs. Le schéma ci-dessous (Figure 1) présente la chaîne de désintégration de l'uranium 238, dans laquelle, par désintégrations successives, l' ^{238}U donne un isotope stable, le plomb 206.

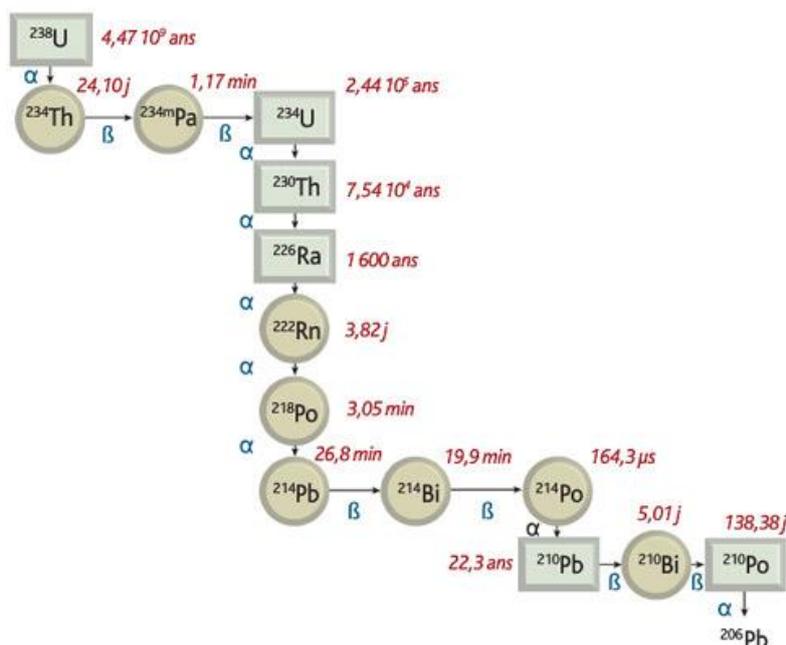
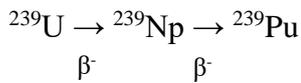
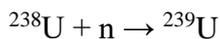


Figure 1 : Chaîne de désintégration de l'uranium 238 (IRSN)

L'uranium 235 a une importance particulière pour l'homme, car c'est un isotope fissible qui se désintègre également sous l'effet d'un neutron thermique. Les avantages de la fissionabilité de l' ^{235}U sont non seulement de produire de grandes quantités d'énergie, mais aussi de synthétiser d'autres éléments appartenant aux actinides importants (Grenthe et al., 2006). Il est le combustible primaire de la plupart des réacteurs nucléaires. L' ^{238}U est quant à lui, un isotope fertile, car il donne un isotope fissile (^{239}Pu), par capture d'un neutron puis deux désintégrations β^- successives. L'uranium, avec sa composition naturelle, peut donc être utilisé dans les réacteurs nucléaires pour générer des neutrons. La réaction en chaîne est entretenue par les neutrons produits de la fission du ^{235}U , tandis que les neutrons en excès de ceux nécessaires à la propagation de la réaction en chaîne peuvent être capturés par l' ^{238}U pour produire du plutonium (Grenthe et al., 2006).



Enfin, du fait de sa radioactivité, l'uranium est, avec le thorium 232 et le potassium 40, la principale source de chaleur du manteau terrestre, le maintenant à haute température et ralentissant son refroidissement.

II- Origine de l'uranium

L'uranium est présent dans la croûte terrestre depuis la formation de la Terre et entre dans la composition de nombreuses roches comme l'uraninite UO_2 , appelée également pechblende, qui est le principal minerai d'uranium (Zavodska, 2008). L'abondance de l'uranium dans la croûte terrestre correspond à peu près à celle du Mo et de l'As et il est plus abondant que le Cu, le Sb, le W et le Cd (Zavodska, 2008). Dans l'environnement, l'uranium provient de l'altération chimique de roches par des eaux souterraines ou de surface (Markich, 2002). Durant cette altération, l'eau se charge en ^{238}U et ^{235}U selon un rapport isotopique constant (137,88 : 1) (Osmond et Ivanovich, 1992) alors que ^{234}U est produit par désintégration α de ^{238}U . A la suite de l'altération de ces roches par érosion ou remaniement géologique, il est dispersé dans

l'environnement et redistribué dans l'ensemble des compartiments des écosystèmes. Cette redistribution est principalement contrôlée par quatre mécanismes : le transport par les eaux (par exemple le lessivage des sols), les phénomènes de diffusion, le transport biologique et la mise en suspension dans l'air (Ribera et al., 1996). La concentration moyenne d'uranium naturel dans la croûte terrestre est de 3mg/kg (Kalin et al., 2005). En Europe, la médiane de la concentration en uranium des sédiments est estimée à 2 mg/kg et le fond géochimique moyen des eaux de surface continentales est de l'ordre de 0,3 µg/l (De Vos et Tarvainen, 2006). En France, le fond géochimique en uranium des eaux est de l'ordre de 0,44 µg/L dans les zones sédimentaires et de 0,15 µg/L dans les zones du socle hercynien, cette différence étant liée à la chimie des eaux, et notamment à leur acidité (Salpeteur et Angel, 2010).

Bien que l'uranium soit uniquement d'origine naturelle, sa présence dans l'environnement peut être due à une redistribution liée aux activités anthropiques. En particulier, quatre sources anthropiques principales peuvent entraîner un enrichissement de l'uranium dans l'environnement (IRSN 2010) :

- Le cycle du combustible nucléaire, depuis l'exploitation minière jusqu'au traitement des déchets.
- L'utilisation militaire d'uranium appauvri car les sites bombardés par des armes nucléaires sont enrichis en fines particules d' $\text{UO}_2(\text{s})$.
- L'utilisation de charbon dont la combustion conduit à l'émission atmosphérique d'uranium.
- L'utilisation agricole d'engrais phosphatés issus de phosphates naturels particulièrement riches en uranium.

III- Spéciation et comportement de l'uranium en milieux naturels

La spéciation de l'uranium en milieu naturel est complexe du fait des nombreuses propriétés de réaction de cet élément, et des différents paramètres environnementaux comme le potentiel d'oxydo-réduction, le pH, la teneur en ligands organiques et inorganiques, la température, la force ionique, la présence d'autres métaux, les particules en suspension et le CO₂ dissous (Markich, 2002 ; Kolhe et al.,2018). Dans un environnement naturel, l'uranium est présent sous différentes formes chimiques : oxydé, précipité, complexé, minéralisé ou sous sa forme élémentaire. L'uranium possède plusieurs états d'oxydation, de +III à +VI (Scapolan, 1996), les valences IV et VI étant celles trouvées majoritairement dans l'environnement (Abdelouas, 2006). Les conditions de passage d'un état de valence à un autre dépendent de différents paramètres (dont le potentiel d'oxydoréduction du milieu) :

- Uranium (III) : A l'état d'oxydation III, l'uranium est un fort agent réducteur qui est lentement oxydé par l'eau mais rapidement par l'air. Les ions U³⁺ peuvent se former par dissolution dans l'eau du trichlorure d'uranium UCl₃. Les solutions contenant des ions U³⁺ sont très réductrices : elles réduisent les molécules d'H₂O avec formation d'ions U⁴⁺ suivant la réaction (Scapolan, 1996) : $\text{H}_2\text{O} + \text{U}^{3+} \rightarrow \frac{1}{2} \text{H}_2 + \text{OH}^- + \text{U}^{4+}$
- Uranium (IV) : Les sels de l'ion U(IV) s'oxydent spontanément mais lentement à l'air pour donner le dioxyde d'uranium UO₂. (Scapolan, 1996).
- Uranium (V) : L'uranium (V) est l'ion le moins stable des ions uranium. Il est présent dans l'eau dans un domaine de pH entre 2 et 2,5, sous la forme UO₂⁺ (Scapolan, 1996).
- Uranium (VI) : L'uranium sous sa forme VI est l'ion uranium le plus stable en solution aqueuse, étant alors sous la forme d'ion uranyle UO₂²⁺. Dans l'eau, l'ion U(VI) n'existe pas et se transforme directement en UO₂²⁺ par la formule suivante (Scapolan, 1996) : $\text{U}^{6+} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{UO}_2^{2+} + 4 \text{H}^+$

La spéciation de l'uranium détermine sa réactivité et de ce fait sa mobilité et sa biodisponibilité. La connaissance de la spéciation de l'uranium dans les milieux naturels est essentielle pour prédire la migration de ce radionucléide. L'uranium à l'état d'oxydation (IV) est présent dans des minerais sous forme d'uraninite [$\text{UO}_2(\text{s})$] ou d'octaoxyde de triuranium (U_3O_8), qui est insoluble, immobile et stable dans des conditions anaérobiques (Arnold et al., 2011 ; Kolhe et al., 2018). U(VI) est l'espèce dominante dans des milieux aquatiques sous conditions oxydantes et sa spéciation dépend fortement du pH. La Figure 2, ci-dessous, présente la prédiction de la spéciation de l'uranium en fonction du pH pour une eau douce modèle à (a) $0,3 \mu\text{g/l}$ et (b) $30 \mu\text{g/l}$ d'uranium (Markich, 2002).

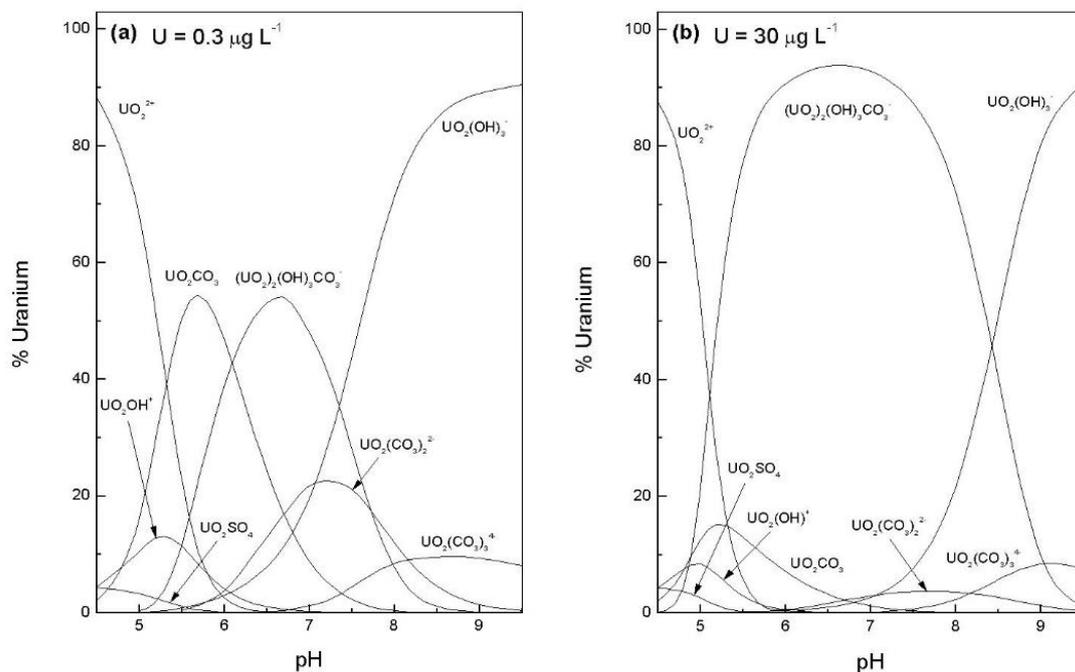


Figure 2 : Spéciation prédite (répartition en %) de U en fonction du pH (4,5 à 9,5) pour une eau douce modèle à (a) $0,3 \mu\text{g/l}$ et (b) $30 \mu\text{g/l}$ sans substances humiques (Markich, 2002)

À des concentrations d'uranium pertinentes pour l'environnement ($<30 \mu\text{g/l}$), U(VI) existe sous la forme d'ion uranyle libre (UO_2^{2+}), qui devient négligeable à $\text{pH} > 6$. C'est la forme la plus mobile, la plus biodisponible et par conséquent la plus toxique (Markich, 2002 ; Kalin et al., 2005 ; Husson et al., 2019) qui domine alors. Entre pH 5 et 7, les formes hydroxylées, tels que $\text{UO}_2(\text{OH})^+$ ou $\text{UO}_2(\text{OH})_2$, apparaissent en l'absence de ligands complexants comme les carbonates, les sulfates et les phosphates. Cependant dans des eaux douces naturelles, le carbonate est un agent complexant naturel important (Markich, 2002). Pour des eaux douces

avec une concentration en uranium $< 0,3 \mu\text{g/l}$, UO_2CO_3 est l'espèce uranyle dominante entre pH 5 et 6, suivie de l'espèce $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_3\text{CO}_3^-$ entre pH 6 à 7,5 ; et enfin $\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$ à pH $> 7,5$ (Figure 2.a). Pour des eaux ayant une concentration d'uranium de $30 \mu\text{g/l}$ (correspondant à des eaux contaminées par des sources d'uranium anthropique), la principale différence est que $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_3\text{CO}_3^-$ est l'espèce dominante entre pH 5 et 8,5 (Figure 2).

Il existe d'autres ligands capables de se complexer avec U(VI) comme les sulfates, les phosphates, les nitrates et les chlorures. L'affinité de complexation de U (VI) avec ces ligands inorganiques diminue dans l'ordre suivant : $\text{CO}_3^{2-} > \text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^-$ (Gadd et Fomina, 2011). La matière organique joue également un rôle important dans la distribution de l'uranium dans les eaux de surface. L'uranium forme des complexes avec les matières organiques particulières qui piègent celui-ci et entraînent son immobilisation. U (VI) forme également des complexes urano-humiques stables avec les acides humiques (Benes et al., 1998, Cumberland et al., 2016 ; Meng et al., 2017) qui contribuent à la migration de l'élément dans les systèmes aquatiques. Dans les eaux douces de surface riches en matières organiques (pH 4,5 à 8), les complexes d'uranyle avec les substances humiques et fulviques sont les espèces dominantes d'uranium dissous (Markich, 2002). Les oxydes de fer et de manganèse sont également connus pour leur forte capacité à adsorber l'uranium et à favoriser la mobilité de cet élément dans les eaux de surface (Stubbs et al., 2006). La spéciation de l'uranium dans l'environnement est donc affectée par la concentration en ligands inorganiques ou organiques. En conclusion, la solubilité de l'uranium dépend des paramètres physico-chimiques du site, qui déterminent la complexation ou les réactions de sorption et précipitation (Husson et al., 2019). De plus, la biodisponibilité de l'uranium, et par conséquent sa toxicité, est fortement dépendant de sa spéciation et donc également des conditions du site (Husson et al., 2019).

IV- Toxicité de l'uranium

La toxicité de l'uranium est déterminée par ses propriétés chimiques et radioactives. En particulier, la radiotoxicité de l'uranium est due aux radiations ionisantes issues de la décroissance des isotopes de l'uranium, et de ses descendants. Cependant, l'uranium étant un émetteur alpha et ayant une activité spécifique faible, ses effets dus aux radiations ionisantes sont généralement négligeables par rapport à sa toxicité chimique. La chimiotoxicité de l'uranium est liée à ses caractéristiques chimiques d'élément trace métallique qui, au niveau

cellulaire, peut induire un stress oxydatif, des interactions avec des protéines mais également avec l'ADN entraînant des cassures simples ou double-brins. L'uranium relâché par les résidus de traitement minier dans l'environnement peut s'accumuler dans les sols ou se déplacer dans des hydrosystèmes. Par conséquent, il peut être introduit dans la chaîne alimentaire terrestre ou aquatique et entraîner un risque écologique pour ces écosystèmes ainsi qu'un risque sanitaire pour l'homme. Le principal risque radiatif pour l'homme survient lorsque l'uranium est inhalé ou ingéré. Les principaux mécanismes d'entrée de l'uranium dans le corps humain sont l'ingestion d'eau contaminée et l'inhalation de poussières contaminées, en particulier dans des milieux où le sol et les eaux souterraines sont contaminés par ce radioélément. L'uranium n'est pas un métal essentiel pour les organismes vivants, cependant il possède une forte affinité pour les groupements phosphates et se lie fortement avec les peptides phosphorylés (Pardoux et al., 2012). Pour les microorganismes, dont les bactéries, la toxicité de l'uranium induit plusieurs effets comme l'inhibition de l'activité microbienne, la distorsion de la surface cellulaire et une perte de viabilité cellulaire, l'inhibition transcriptionnelle et translationnelle, l'arrêt de la croissance, la suspension de la réplication de l'ADN et des dommages oxydatifs (Kolhe et al., 2018 ; Shuryak, 2019). En conséquence, pour résister à la toxicité de l'uranium, les bactéries ont mis en place divers mécanismes leur permettant de se développer dans ces conditions.

Partie B : Impact de la radioactivité sur les bactéries

I- Généralités sur les bactéries

Antoine van Leeuwenhoek (1632-1723) est le premier scientifique à observer et décrire des microorganismes en 1676 grâce à un microscope construit par lui-même. Il avait employé le terme « animalcules » pour qualifier les diverses formes présentes dans des échantillon d'eau. Depuis ce jour, les microbiologistes définissent un microorganisme comme un organisme vivant unicellulaire, qui est invisible à l'œil nu et uniquement observable à l'aide d'un microscope. Les microorganismes sont représentés dans les trois domaines du vivant : *Eukarya*, *Archeae* et *Bacteria*. Dans chacun de ces domaines, l'organisation cellulaire, la génétique et la physiologie des microorganismes sont différentes. La suite de ce manuscrit sera focalisée sur les microorganismes affilés au domaine *Bacteria*, plus communément appelés « bactéries ».

Les bactéries sont les premiers êtres vivants à être apparus sur Terre. En effet, les premières traces de vie ont été trouvées dans des roches sédimentaires provenant de sources hydrothermales sub-océaniques datées de plus de 3,7 milliards d'années au Canada (Dodd et al., 2017). Les premiers signes de vie sur Terre ont également été trouvés dans des sources hydrothermales en Australie datées de 3,5 milliards d'années (Djokic et al., 2017).

Les bactéries sont des microorganismes procaryotes unicellulaires, dont la structure ne comporte pas de noyau et d'organites comme les mitochondries et les chloroplastes (Figure 3). La structure cellulaire des bactéries est caractérisée par la présence d'une paroi cellulaire. Cette paroi donne la forme de la bactérie et la protège contre l'éclatement dû à la forte pression osmotique du cytoplasme. De plus la membrane cytoplasmique et la paroi assurent le contact et les échanges avec l'environnement, et sont essentielles pour le transport de nutriments. Chez les bactéries, ils existent 2 grands types de paroi : les bactéries Gram⁺ qui possèdent une paroi composé d'un peptidoglycane épais, et les bactéries Gram⁻ définies par un peptidoglycane fin situé entre la membrane cytoplasmique et une membrane cellulaire externe. Au niveau intracellulaire, les bactéries ne possèdent pas de noyau, et leur matériel génétique est constitué d'un seul chromosome d'ADN, généralement circulaire, situé dans un corps de forme irrégulière appelé nucléoïde, présent dans le cytoplasme. Les ribosomes, présents également dans le cytoplasme des cellules, permettent la synthèse protéique grâce au mécanisme de la traduction. La mobilité des cellules est assurée par la présence d'un flagelle, structure

extracellulaire, et des fimbriae permettant l'attachement à des surfaces solides ou à d'autres cellules. Enfin, quelques bactéries telles que *Bacillus* ou *Clostridium*, peuvent former des endospores leur permettant de résister à certaines conditions de stress environnemental ou chimique (Nicholson et al., 2000). La taille d'une cellule de procaryote est de l'ordre du micron (μm). Cependant, il existe une grande disparité dans la taille d'une cellule procaryote. Les bactéries les plus petites capables de s'auto répliquer appartiennent au genre *Mycoplasma*, dont *Mycoplasma pneumonia* qui a une taille d'environ 0,2 à 0,3 μm (Taylor-Robinson et Jensen, 2011). A l'opposé, la cellule bactérienne la plus grande, *Candidatus Thiomargarita magnifica*, a récemment été identifiée en Guadeloupe et mesure jusqu'à 9mm (Volland et al., 2022).

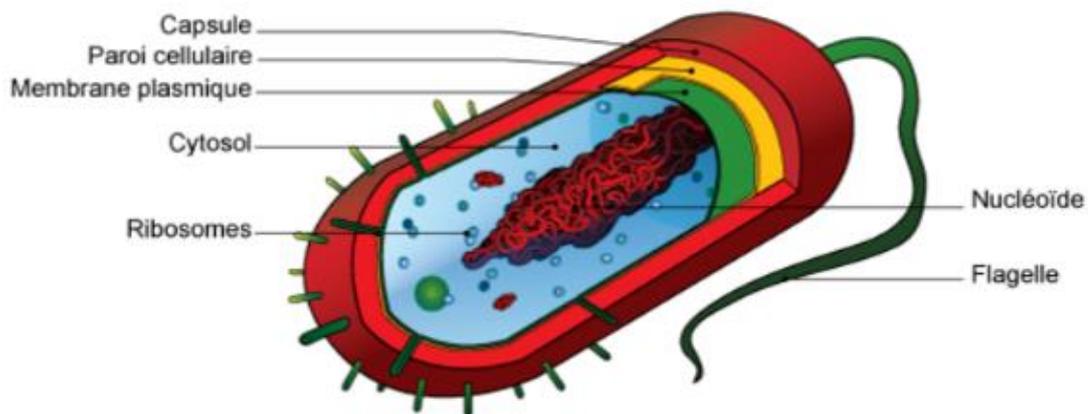


Figure 3 : Schéma de la structure cellulaire d'une cellule bactérienne

La diversité des bactéries est présentée à partir de leur taxonomie qui est la science de la classification biologique. La taxonomie permet de classer les organismes en groupes ou taxons, de différents niveaux hiérarchiques, selon leur similitude ou leur parenté. La taxonomie a longtemps reposé sur des critères phénotypiques tel que la base de la structure cellulaire, le métabolisme cellulaire, la physiologie, etc. Cependant, bien que ces méthodes aient permis de classer et identifier des souches bactériennes, il n'était pas clair que ces différences représentaient une variation entre deux espèces distinctes. De nos jours, la taxonomie repose essentiellement sur des critères génotypiques, dont principalement le séquençage de gènes qui n'ont pas subi de transfert horizontal important, comme le gène de l'ARNr 16S. Un organisme procaryote, dont la séquence du gène de l'ARNr 16S diffère de plus de 3% de toutes les séquences connues, est considéré comme une nouvelle espèce.

Les bactéries présentent une très grande variété de type de métabolisme. Les différents métabolismes microbiens sont classés en groupes nutritionnels et se basent sur trois critères majeurs : la source d'énergie, les donneurs d'électrons utilisés et la source de carbone utilisée (Zillig, 1991). Les bactéries utilisant la lumière comme source d'énergie primaire en utilisant la photosynthèse sont nommées phototrophes. Celles utilisant un composé chimique comme source d'énergie primaire sont nommés chimiotrophes. Les chimiotrophes utilisent des composés chimiques comme source d'énergie en transférant des électrons d'un donneur d'électrons à un accepteur d'électrons terminal dans une réaction d'oxydo-réduction. Dans cette catégorie, il existe les bactéries utilisant des molécules inorganiques comme source d'énergie, nommées chimiolithotrophes, et celles utilisant une molécule organique, nommées chimioorganotrophes. Les composés utilisés comme accepteurs d'électrons sont également utilisés pour classer les bactéries : les organismes aérobies utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons, alors que les organismes anaérobies utilisent d'autres composés comme le nitrate, le sulfate ou le dioxyde de carbone (Slonczewski et al., 2020). Enfin, par rapport à la source de carbone, lorsque des bactéries utilisent du carbone inorganique, elles sont nommées autotrophes et celles utilisant du carbone organique sont nommées hétérotrophes. Ils sont présents dans de nombreux habitats sur Terre grâce à leur capacité métabolique leur permettant de se développer dans une large gamme de conditions environnementales (Abatenh et al., 2017) et sont impliqués dans de nombreux cycles biogéochimiques naturels (hydrogène, carbone, azote, oxygène et soufre) (Falkowski et al., 2008). Ils contribuent également à la digestion dans les tractus digestifs des animaux, à produire des antibiotiques utilisés en médecine, à épurer les eaux usées ou également à extraire le cuivre et autres métaux des minerais.

Dans leur environnement naturel, les bactéries se développent en communautés complexes qui interagissent ensemble : échange de nutriments, compétition pour un substrat, production de substances chimiques. Les réactions microbiennes contrôlent, en partie ou en totalité, la composition chimique de nombreux environnements très différents tels que les sédiments, les sols, les lacs et les eaux souterraines. De nombreuses bactéries sont associées à d'autres organismes vivants (tels que les plantes et les animaux) avec lesquels ils peuvent former des associations complexes. En particulier, les bactéries peuvent former des associations complexes entre-elles, s'attacher à des surfaces et former des agrégations appelées biofilms. Dans ces biofilms, les bactéries forment des arrangements complexes de cellules et de composants extracellulaires, formant des micro-colonies leur permettant de créer un réseau de canaux entre-elles pour la diffusion de nutriments.

Du fait de ce large panel métabolique, et de leur capacité de se développer en communautés complexes interagissant ensemble, les bactéries sont capables de coloniser tous les écosystèmes et participent à la stabilité écologique existant à la surface de la Terre. Des bactéries sont trouvées dans des écosystèmes aquatiques, où les matières organiques en suspension et minéraux dissous permettent leur développement. Elles sont également trouvées dans des écosystèmes terrestres, où elles jouent un rôle dans le cycle des nutriments des sols, notamment pour la fixation d'azote (Falkowski et al., 2008). Enfin, des habitats qualifiés d'extrêmes, où aucun organisme complexe ne peut se développer, abritent des bactéries, qualifiées d'extrémophiles.

II- Les bactéries peuplant les milieux extrêmes

Une bactérie dite extrémophile est une bactérie qui se développe dans des conditions physiques ou géochimiques extrêmes, qui est préjudiciables à la majorité des formes de vie sur Terre (Gupta et al., 2014). Ces bactéries se développent de manière optimale dans ces conditions extrêmes de température, de pression, de rayonnement, de disponibilité de l'eau, de salinité et de pH. De nos jours, les organismes procaryotes extrémophiles sont très étudiés, notamment par les enzymologistes afin de les exploiter pour diverses biotechnologies (Van den Burg, 2003). En effet, les processus métaboliques et les fonctions biologiques spécifiques de ces bactéries sont dus à leurs enzymes et protéines qui sont adaptées pour fonctionner de manière optimale dans ces environnements extrêmes. Ces enzymes présentent des caractéristiques uniques telles qu'une stabilité thermique extrême et une résistance aux dénaturants chimiques, dont des pH extrêmes (Gaur et al., 2010 ; Gupta et al., 2014 ; Karan et al., 2011). En fonction des conditions extrêmes dans lesquelles les bactéries se développent, elles sont définies par différents termes : thermophile (croissance optimale entre 60 et 80°C), hyperthermophile (croissance optimale au-dessus de 80°C), psychrophile (croissance optimale entre 0 et 20°C), acidophile (croissance optimale entre pH 1 et pH 5), alcaliphile (croissance optimale au-dessus de pH 9), halophile (croissance optimale dans des environnements à forte concentration en sels), piézophile (croissance optimale à une pression hydrostatique élevée), oligotrophe (croissance dans des environnements limités en nutriments), endolithique (croissance dans la roche ou dans les pores des minéraux) et xérophile (croissance dans des conditions sèches, avec une faible disponibilité en eau). Certaines bactéries ont même la capacité de se développer dans des environnements fortement contaminés par la radioactivité,

et semblent être naturellement résistantes à cette radioactivité. Ces bactéries très résistantes à des niveaux élevés de rayonnements ionisants sont connus sous le nom de radiophiles (Gupta et al., 2014).

III- Radiorésistance des bactéries

Des bactéries se développant dans des milieux aux niveaux de contamination radioactive élevés, comme la zone d'accident de la centrale nucléaire de Tchernobyl (Chapon et al., 2012 ; Ragon et al., 2011), semblent naturellement résister à cette radioactivité. Ce phénomène de radiorésistance est souvent associé à des modifications génétiques affectant la réparation de l'ADN et les fonctions métaboliques. Celle-ci a probablement évolué chez les organismes exposés à des conditions de stress génotoxiques et oxydatifs (rayonnement UV, produits chimiques toxiques) dans leur environnement naturel. La réduction du taux de croissance et une flexibilité métabolique semblent être des caractéristiques de nombreux phénotypes de résistances au stress (Shuryak., 2019). Par exemple de nombreux procaryotes radiorésistants (*Deinococcus radiodurans*) ont un taux de croissance et de reproduction plus lent que les procaryotes radiosensibles (*Escherichia coli*) (Sharma et al., 2013) La radiorésistance implique non seulement la réparation de l'ADN, mais aussi le bon fonctionnement des protéines et autres systèmes nécessaires pour cette réparation et pour maintenir une homéostasie cellulaire après une exposition aux rayonnements ionisants. Des mécanismes incluant des antioxydants non enzymatiques et des ajustements physiologiques pour lutter contre le stress oxydatif peuvent également être mis en place par les bactéries radiorésistantes, en synergie avec les systèmes de réparations de l'ADN. Les bactéries du genre *Deinococcus* sont connues pour être résistantes aux radiations ionisantes ainsi qu'à autres agents génotoxiques en tant que cellules végétatives métaboliquement actives contrairement à d'autres microbes qui ne résistent que lors de phases de repos sous forme de spores. Ils peuvent également proliférer sous des niveaux élevés de radiation chronique, ce qui suggère que leurs systèmes de réparation des dommages à l'ADN peuvent fonctionner efficacement même lors d'une induction continue de dommages par les rayonnements ionisants (Shuryak., 2019).

Cependant, à fortes concentrations, les radionucléides, notamment l'uranium, contribuent à une pression persistante sur les communautés bactériennes par leurs impacts délétères sur la diversité microbienne, la variabilité génétique au sein des taxons et la richesse (Bondici et al., 2013 ; Hoyos-Hernandez et al. 2019, Mondani et al., 2011 ; Sutcliffe et al., 2017 ; Yan et Luo,

2015). En plus d'être un émetteur alpha et de former des produits de désintégration, tels que le radium 226, l'uranium présente une chimiotoxicité. Ce second processus est généralement considéré comme plus impactant (Chandwadkar et al., 2018) et est directement lié à la biodisponibilité des radionucléides et donc à la spéciation chimique (Bresson et al., 2011 ; Salbu, 2007). Par conséquent, la composition de la communauté microbienne est connue pour être spécifique aux sites et liée aux niveaux de concentration et/ou aux différentes conditions environnementales géochimiques et physiologiques (Dhal et al., 2011 ; Lopez-Fernandez et al., 2021 ; Radeva et al., 2013).

IV- Impact de l'uranium sur les communautés bactériennes

Un certain nombre d'études ont montré un effet de fortes concentrations d'uranium sur la structure des communautés microbiennes (Hoyos Hernandez et al., 2019 ; Jaswal et al., 2019 ; Li et al., 2018 ; Mondani et al., 2011 ; Mumtaz et al., 2018 ; Radeva et al., 2013 ; Rogiers et al., 2021 ; Sitte et al., 2015 ; Suriya et al., 2017 ; Yan et Luo, 2015 ; Zeng et al., 2020). Cependant, il est difficile d'observer une réponse universelle des communautés microbiennes indigènes à la contamination par les radionucléides (Rogiers et al., 2021). En général, il a été observé que les sites contaminés par les radionucléides présentent une grande variété de micro-organismes organisés en communautés complexes spécifiques aux sites (Dhal et al., 2011 ; Dhal, 2018 ; Islam et al., 2011 ; Martinez et al., 2006 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008). Bien que dans certaines études, aucune association claire entre la contamination par l'uranium et la diversité bactérienne n'ait été observée (Li et al., 2018), d'autres études montrent un changement significatif de la diversité bactérienne. Certaines études montrent une diminution de la diversité bactérienne dans les sites contaminés (Hoyos Hernandez et al., 2019 ; Rogiers et al., 2021 ; Suriya et al., 2017), tandis que d'autres montrent une augmentation de la diversité (Radeva et al., 2013 ; Theodorakopoulos et al., 2017 ; Zeng et al., 2020). L'uranium pourrait entraîner une pression sélective sur les bactéries qui font évoluer les communautés bactériennes indigènes vers une composition dominée par des espèces résistantes qui conduisent à des communautés tolérantes à des niveaux de contamination spécifiques aux sites (Chandwadkar et al., 2018 ; Hoyos Hernandez., 2019 ; Jaswall et al 2019 ; Martinez et al., 2006; Mondani et al., 2011 ; Radeva et al 2013 ; Rogiers et al., 2021). Dans ce but, plusieurs études ont décrit les communautés bactériennes présentes dans des environnements contaminés en uranium. Le Tableau 2, ci-dessous, résume les résultats obtenus dans ces études.

Tableau 2 : Synthèse bibliographique des recherches menées sur les communautés bactériennes provenant de sites contaminés en uranium

Auteurs	Site d'étude	Concentration en uranium ($\mu\text{g/g}$)	Temps d'exposition	Effets sur les communautés bactériennes	Phylum majoritaire
Zeng et al., 2020	sédiments exposés à différentes concentrations d'U	11	courte exposition ~ 24h	Diminution de la richesse bactérienne mais augmentation de la diversité	<i>Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes</i>
Suriya et al 2017	Sédiments de surface le long de la rivière Cauvery dans le district d'Erode (pollués par l'uranium)	1,27	exposition à long terme	Diversité bactérienne diminue dans le site pollué	<i>Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes</i>
Mondani et al., 2011	gisements naturels d'uranium (échantillon de sol)	255000	exposition à long terme	Modification population bactérienne entre site avec U et contrôle	<i>Acidobacteria, Proteobacteria, Geobacter</i>
Radeva et al 2013	Echantillon de sols du complexe minier	374	exposition à long terme (depuis 1960)	Richesse et diversité bactérienne augmente	<i>Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes</i>
Jaswal et al., 2019	Echantillon de sols d'un bassin de décantation pour l'extraction d'uranium	1000	exposition à long terme	-	<i>Proteobacteria</i>
Li et al., 2018	échantillon d'eau + sédiment d'un site contaminé en uranium (Oak Ridge Field Research Center)	10	exposition à long terme	Pas de différence de diversité alpha, ni de la composition bactérienne	<i>Proteobacteria</i>
Mumtaz et al., 2018	sols des zones de la mine d'uranium de Ranger	faible (2-20), moyen (200-400), forte (500-900), très forte (>900)	exposition à long terme	La diversité de la communauté bactérienne à faible niveau d'U est significativement différente de celle des niveaux moyen, haut et très haut	<i>Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria</i>
Rogiers et al., 2021	sol d'une prairie contaminée en uranium du bassin de la rivière Grote Nete	9,8	exposition à long terme	Diversité alpha plus faible dans les sites contaminés	<i>Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria and Verrucomicrobia</i>
Sitte et al., 2015	échantillons de sols et de sédiments prélevés dans l'ancien site minier d'uranium de Ronneburg	1569 (sol) / 53 (sédiment)	exposition à long terme	Composition et richesse bactérienne non affectée par l'uranium	<i>Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria</i>
Yan et al., 2016	échantillons de sol provenant de zones contaminées par l'uranium	48,1	exposition à long terme	La communauté, la structure et les fonctions microbiennes du sol présentent des changements significatifs dans les sols contaminés	<i>Actinobacteria, Proteobacteria</i>
Kumar et al., 2013	échantillons de sol autour d'un gisement riche en U	1200	exposition à long terme	-	<i>Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes</i>
Rastogi et al., 2009	sols contaminés par l'exploitation minière d'uranium	8	exposition à long terme	-	<i>Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes</i>
Cho et al., 2012	Puits d'eau souterraine contaminé en uranium (Oak Ridge Field Research Center)	gamme d'uranium (0,73 à 60,36)	exposition à long terme	Diversité bactérienne diminue en fonction des niveaux de contamination en uranium des puits	<i>Proteobacteria</i>

Cette synthèse bibliographique démontre que les taxons affiliés aux *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Acidobacteria* sont dominants dans des environnements contaminés en uranium et pourraient présenter des métabolismes spécifiques leur permettant de résister à de fortes concentrations d'uranium. Outre la description et la distribution de ces communautés bactériennes dans des environnements contaminés en uranium, il est également nécessaire d'obtenir des informations sur la physiologie des bactéries isolées dans ces environnements particuliers (Merroun et Selenska Pobell, 2008). En effet, ces communautés bactériennes, très bien adaptées aux fortes concentrations en uranium, jouent un rôle majeur dans la mobilité de l'uranium dans l'environnement (Kolhe et al., 2018 ; Lopez-Fernandez et al., 2021 ; Merroun et Selenska Pobell, 2008 ; Shukla et al., 2017) par divers mécanismes décrits dans la partie suivante.

Partie C : Rôle des bactéries dans la spéciation (mobilité) de l'uranium

Les processus bactériens peuvent affecter significativement la mobilité des radionucléides dans l'environnement, en particulier l'uranium. Les bactéries peuvent interagir par des processus indirects avec l'uranium en modifiant l'environnement local, comme par exemple le pH ou le potentiel d'oxydoréduction, ce qui peut entraîner une modification de la spéciation de l'uranium. D'autre part, les interactions directes correspondent à une action de la bactérie sur l'uranium, soit par un changement d'état d'oxydation de l'uranium, ou par accumulation, adsorption, complexation avec des protéines, polysaccharides et des biomolécules microbiennes (Fashola et al., 2016 ; Kolhe et al., 2018; Lloyd, 2003 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008). Il existe quatre mécanismes principaux d'interaction des bactéries avec l'uranium entraînant son immobilisation : la biosorption, la bioaccumulation, la bioréduction et la biominéralisation, résumés sur la Figure 4 ci-dessous :

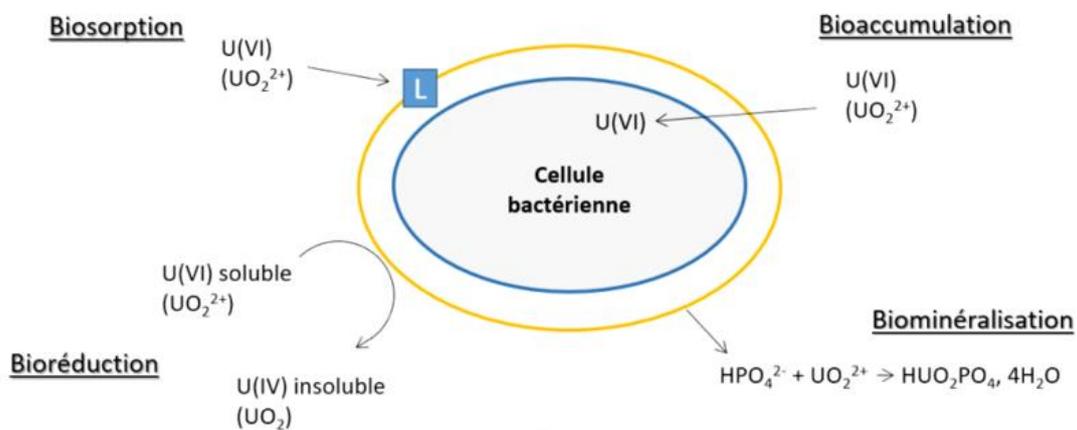


Figure 4 : Mécanisme d'interaction entre bactéries et uranium conduisant à une immobilisation de l'uranium dans l'environnement (d'après Kolhe et al., 2018)

De nombreuses espèces bactériennes ont été étudiées pour leur capacité à interagir avec l'uranium et modifier sa spéciation. Le Tableau 3 ci-dessous présente quelques souches bactériennes interagissant avec l'uranium référencées dans la littérature.

Tableau 3 : Exemples de bactéries étudiées pour leur capacité à interagir avec l'uranium

Mécanisme	Souche	Auteurs
Bioréduction	<i>Cellulomonas sp. (WS01, WS18, et ES5)</i>	Sani et al., 2002
	<i>Shewanella putrefasciens</i>	Lovley et al., 1991
	<i>Bacillus sp. dwc-2</i>	Li et al., 2017
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Chabala et al., 2010
	<i>Shewanella oneidensis strain MR-1</i>	Sheng et Fein, 2014
Biosorption / bioaccumulation	<i>Acidovorax facilis</i>	Gerber 2016
	<i>Arthrobacter strain S3</i>	Suzuki et Banfield, 2004
	<i>Bacillus sphaericus JG-A12</i>	Merroun et al., 2005
	<i>Bacillus thuringiensis strain (BRC-ZYR3 et BRC-ZYR4)</i>	Pan et al., 2015
	<i>Bacillus cereus 12-2</i>	Zhang et al., 2018
Bioprécipitation	<i>Microbacterium oleivorans A9</i>	Theodorakopoulos et al., 2015
	<i>Acinetobacter sp. YU-SS-SB-29</i>	Sowmya et al., 2014
	<i>Aeromonas hydrophila strain M1</i>	Shelobolina et al., 2009
	<i>Caulobacter crescentus</i>	Yung et Jiao, 2014
	<i>Chryseobacterium sp. strain PMSZPI</i>	Khare et al., 2020
	<i>Serratia sp. strain OT II 7</i>	Chandwadkar et al., 2018

I- Biosorption

La biosorption décrit l'adsorption passive et l'accumulation de métaux ou de radioéléments à la surface des cellules microbiennes vivantes ou mortes (Kolhe et al., 2018). Le phénomène de biosorption peut se produire directement, par interaction entre un ion métallique cationique avec les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire anionique, ou il peut être indirect, soit avec des polysaccharides extracellulaires (EPS) sécrétés par des bactéries, la couche S (S-layer) ou la capsule des bactéries. Les ligands de la paroi cellulaire tels que les groupes carboxyle, amine, hydroxyle, phosphate et sulfhydryle lient les métaux par sorption chimique (Kolhe et al., 2018 ; Lopez-Fernandes et al., 2021 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008). L'adsorption d'uranium sur la surface cellulaire est due aux forces d'attraction électrostatique existant entre les cations métalliques et la surface cellulaire chargée négativement, entraînant une liaison électrostatique. Les processus métaboliques n'étant pas impliqués, ce phénomène est souvent rapide. La biosorption entraîne l'immobilisation du radionucléide à la surface des bactéries. Le processus est spécifique à l'espèce et est influencé par la température, le pH, la sécrétion ou la production d'exopolymères, la présence de composés organiques ou inorganiques et de métabolites (Shukla et al., 2017).

Théoriquement, toutes les bactéries seraient capables de biosorber l'uranium, cependant selon la structure de leur paroi (Gram⁺ ou Gram⁻), des différences peuvent être observées. Chez

les bactéries Gram⁺, l'adsorption de l'uranium intervient préférentiellement avec la couche de peptidoglycane externe de la membrane plasmique riche en groupes carboxyles et phosphates (Merroun et Selenska-Pobell, 2008). Pour les bactéries Gram⁻, les phospholipides et les groupes phosphates de la couche de lipopolysaccharide sont particulièrement importants dans la fixation des ions uranyles (Kolhe et al., 2018).

La couche S de bactéries, structure cristalline composée de glycoprotéines qui recouvre entièrement la surface de certaines cellules bactériennes, peut également adsorber l'uranium à la surface des cellules. En effet, la couche S des bactéries, dont la structure protéique est majoritairement formée de groupements carboxyles et phosphorylés (Merroun et Selenska-Pobell, 2008) peut être impliquée dans la complexation de l'uranium à la surface des cellules. Par exemple, la souche *Bacillus sphaericus* JG-A12, isolée d'une fosse à déchets d'extraction d'uranium, possède une couche S capable de fixer l'uranium grâce à ses groupes phosphates et carboxyles (Merroun et al., 2005). La Figure 5 montre la localisation cellulaire de l'uranium sur la couche interne de la couche S, où les groupes chargés négativement sont situés. La forte affinité des groupes phosphates présents à la surface cellulaire permet à *Bacillus sphaericus* JG-A12 de se lier sélectivement à de grandes quantités d'uranium avant d'être endommagée par ce radionucléide toxique (Merroun et al., 2005).

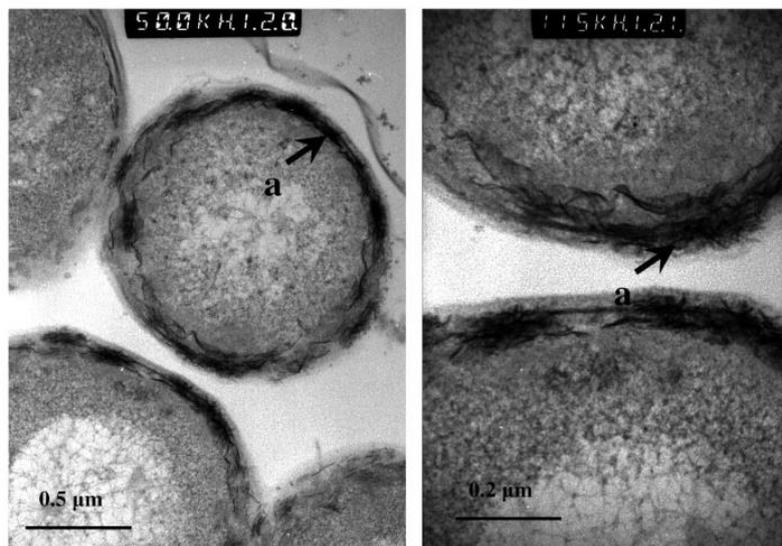


Figure 5 : Observation en microscopie électronique en transmission de la localisation de l'uranium (a) à la surface des cellules de *Bacillus sphaericus* JG-A12 (Merroun et al., 2005)

De plus, certaines espèces bactériennes peuvent produire des substances polymériques extracellulaires (EPS) qui sont principalement composées de polysaccharides, de protéines,

d'acides nucléiques et de lipides, contenant des groupes fonctionnels tels que les carboxyles, phosphores, amines et hydroxyles qui représentent des sites de liaisons potentiels pour la séquestration des ions uranium (Merroun et Selenska-Pobell, 2008). Par exemple, une cyanobactérie marine, *Synechococcus elongatus*, a été étudiée pour ses propriétés à adsorber l'uranium à des valeurs de pH environnementales, grâce à la production de polysaccharides extracellulaires (EPS) (Acharya et al., 2013). Ce phénomène permet de limiter le transport des métaux vers l'intérieur de la cellule.

Cependant, la biosorption est limitée par la saturation rapide des sites de liaison de la paroi cellulaire, ainsi que par la désorption compétitive, due à des cations, autres que ceux souhaités, pour un site de liaison de la cellule (Jabbar et Wallner, 2015). De plus, le matériel sorbé pourrait être remis en solution lorsque les cellules meurent et se décomposent, bien que dans une étude, la décomposition cellulaire simulée ait facilité la précipitation du phosphate d'uranyle (Knopp et al., 2003).

II- Bioaccumulation

Les cellules bactériennes sont également capables d'accumuler plusieurs radioéléments, dont l'uranium, via des mécanismes de bioaccumulation. La bioaccumulation peut être résumée comme étant un enrichissement de contaminants dans un organisme par rapport à son environnement (Newsome et al., 2014). Le processus de bioaccumulation peut être à la fois passif ou actif. La pénétration d'uranium dans les cellules microbiennes est effectuée par les voies classiques de transports, comme le ferait un ion essentiel impliqué dans la physiologie des cellules. L'accumulation active de l'uranium est due à une absorption fortuite de ce radioélément du fait de sa similitude avec des éléments essentiels nécessaires au fonctionnement des cellules ou en raison d'une augmentation de la perméabilité membranaire causée par la toxicité de l'uranium (Lopez-Fernandez et al., 2021). Plusieurs bactéries ont été étudiées et mises en évidence pour leur capacité à accumuler l'uranium dans leurs cellules. Les cellules de *Stenotrophomonas maltophilia JG-2*, souche isolée à partir de déchets d'uranium, accumulent l'uranium de manière importante sous forme de cristaux à l'intérieur des cellules (Merroun et Selenska-Pobell, 2008). La souche *Bacillus sp. dwc-2*, isolée d'un site de dépôt de déchets d'uranium, a également révélé sa capacité à absorber l'uranium. Les observations MET des cellules bactériennes exposées à une solution d'uranium ont montré que l'uranium était

principalement accumulé dans la région cytoplasmique sous forme de granules denses. (Li et al., 2014).

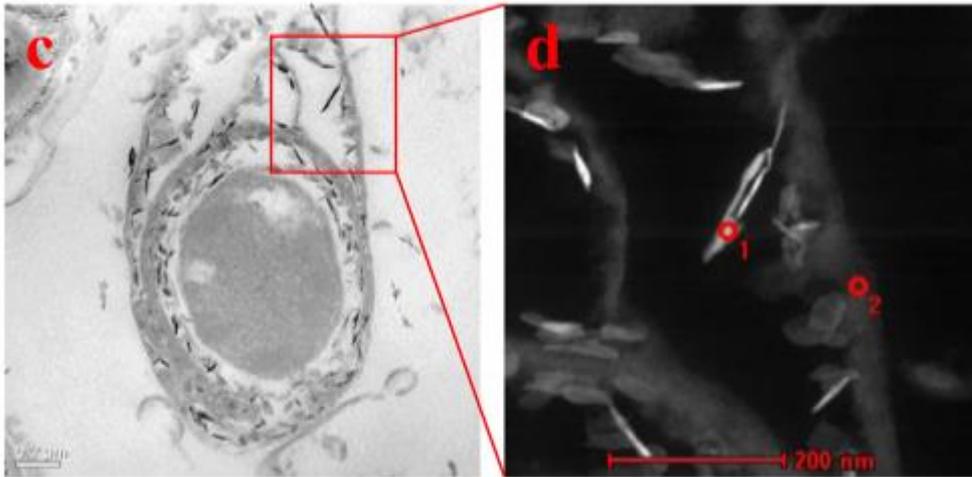


Figure 6 : Observation en microscopie électronique en transmission de la localisation de l'uranium (c et d) à l'intérieur des cellules de *Bacillus sp. dvc-2* (Li et al., 2014)

III- Biominéralisation

La biominéralisation (ou bioprécipitation) est un mécanisme entraînant la précipitation de métaux stables, tel l'uranium, par des ligands produits par voie enzymatique par certaines bactéries tels que des phosphates, carbonates et sulfures, et constitue un moyen d'éliminer l'uranium d'une solution (Kolhe et al., 2018 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008 ; Newsome et al., 2014 ; Shukla et al., 2017). Le produit final de ce processus est généralement un minéral insoluble, d'où le terme biominéralisation plus que bioprécipitation (Kolhe et al., 2018). L'avantage de la formation de ligands bactériens est qu'une concentration élevée de ligands est obtenue en juxtaposition avec les surfaces cellulaires, ce qui peut fournir des sites de nucléation pour une initiation rapide de la précipitation de l'uranium (Merroun et Selenska-Pobell, 2008).

De nombreuses recherches récentes se sont orientées vers la biominéralisation de l'uranium par des bactéries aérobies ou anaérobies présentant une activité enzymatique de type phosphatase (Sánchez-Castro et al., 2020). Ces bactéries possèdent des phosphohydrolases (également appelé phosphatases) qui sont classées en phosphatases acides ou alcalines en fonction du pH requis pour leur activité optimale (Sánchez-Castro et al., 2020). Ces

phosphatases sont libérées soit à l'extérieur de la membrane plasmique, soit intégrées en tant que composantes de la membrane. La fonction principale des phosphatases est de soutenir la nutrition microbienne en libérant des orthophosphates au cas où ils ne seraient pas présents dans l'environnement (Sánchez-Castro et al., 2020). Ces orthophosphates inorganiques, libérés dans l'environnement, peuvent interagir comme ligands en présence de cations, tel que l'ion uranyle (UO_2^{2+}), induisant la biominéralisation de l'U(VI) et réduisant par conséquent sa biodisponibilité et sa toxicité pour les bactéries (Sánchez-Castro et al., 2020). En particulier *Serratia sp. strain OT II 7* (isolée du gisement d'uranium de Domiasiat (Inde)) (Chandwadkar et al., 2018) et *Serratia sp.* (isolée du site nucléaire de Sellafield (Royaume Uni)) (Newsome et al., 2015) ont été étudiées pour leur capacité à biominéraliser l'uranium en présence d'une source de phosphate dans le milieu (β -glycérophosphate). Cette précipitation est possible grâce aux enzymes phosphatases de ces souches bactériennes permettant la libération de phosphates, à partir de l'hydrolyse du substrat organophosphoré, qui vont se complexer avec l'uranium et former des cristaux de phosphate d'uranium insolubles (Chandwadkar et al., 2018 ; Newsome et al., 2015). Plusieurs facteurs, dont les activités spécifiques des phosphatases, les sites de nucléation à la surface des cellules, les pH optimaux des phosphatases, la spéciation aqueuse de l'uranium et la localisation cellulaire des phosphatases, individuellement ou en combinaison, contribuent à l'efficacité du processus de bioprécipitation de l'uranium. (Chandwadkar et al., 2018)

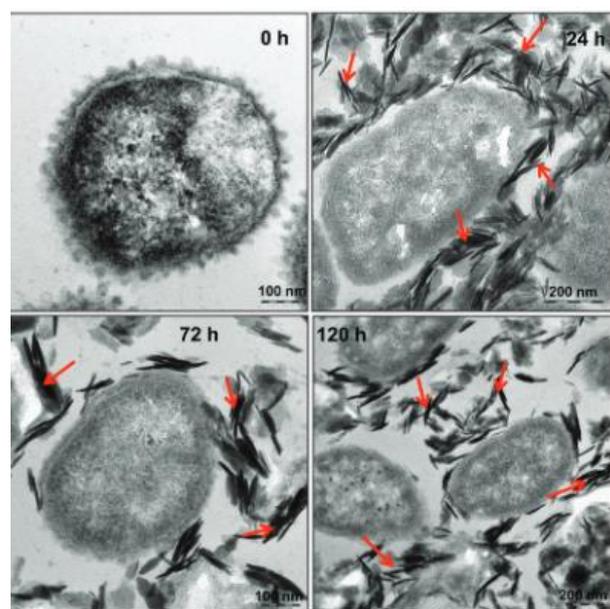


Figure 7 : Observation en microscopie électronique en transmission de la localisation de l'uranium (flèche rouge) dans l'espace extracellulaire des cellules de *Serratia sp. strain OT II 7* (Chandwadkar et al., 2018)

IV- Bioréduction

Le processus de bioréduction consiste en la réduction bactérienne de l'uranium (VI) soluble en uranium (IV) insoluble, liée à une modification de son état d'oxydation par le biais de processus métaboliques (Kolhe et al., 2018). En effet, en absence d'oxygène, les bactéries sont capables de respirer différents accepteurs d'électrons, comme l'uranium, afin d'obtenir l'énergie nécessaire à leur métabolisme (Newsome et al., 2014). Ce phénomène fut mis en évidence avec la souche *Veillonella alcalescens* (Woolfolk et Whiteley 1962) mais également sur *Geobacter metallireducens* et *Shewanella putrefaciens* (Lovley et al., 1991) qui sont des bactéries ferro-réductrices. À pH neutre, l'U(VI) présente un couple redox similaire à celui du Fe(III), et les bactéries réduisant le Fe(III) sont capables de respirer l'U(VI) en tant qu'accepteur d'électrons alternatif, en le réduisant en U(IV) insoluble (Lovley et al., 1991). Jusqu'à maintenant, plusieurs espèces bactériennes ont démontré leur capacité à bioréduire l'uranium dont des bactéries sulfato-réductrices, des bactéries thermophiles, des bactéries acidotolérantes et des bactéries fermentaires (Merroun et Selenska-Pobell, 2008). La réduction de l'U(VI) entraîne généralement la formation d'uraninite (UO_2), via l'activité de cytochrome de type c, et qui peut être localisée en dehors des bactéries (Lovley et Phillips, 1992), mais également dans le périplasma (Suzuki et al., 2004) et sur les membranes (Abdelouas et al., 1998) comme illustré sur la Figure 8. Cette bioréduction de l'U(VI) en U(IV) peut jouer un rôle important dans le cycle géochimique de l'uranium et peut également servir de mécanisme de bioremédiation d'eaux contaminées par l'uranium.

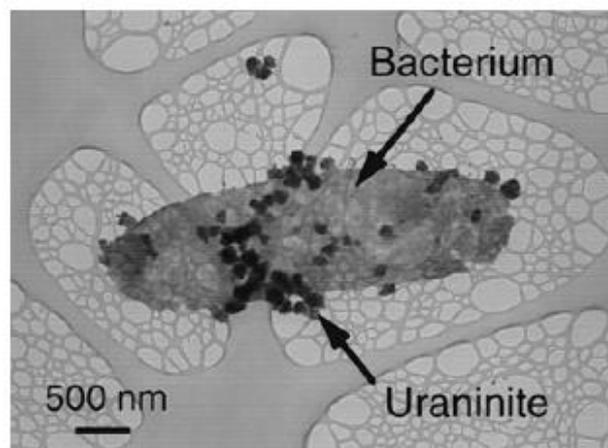


Figure 8 : Observation en microscopie électronique à balayage de la localisation de précipités d'uraninite à la surface des cellules de *Shewanella putrefaciens* (Abdelouas et al., 1998)

V- Bioremédiation de l'uranium dans l'environnement

De par leur capacité à transformer l'uranium d'une forme mobile et biodisponible, à une forme insoluble, moins biodisponible et par conséquent, moins toxique, l'utilisation de bactéries *in situ*, peut être envisagée pour des processus de décontamination, ou bioremédiation (Kolhe et al., 2018). En particulier, la bioréduction *in situ* a déjà été utilisée pour immobiliser l'uranium dans des environnements contaminés, tel que dans des eaux souterraines d'une nappe d'aquifère contaminée par l'uranium (Anderson et al., 2003). En effet, dans cette étude, les eaux souterraines de cette ancienne installation de traitement de minerai d'uranium sont contaminées par de faibles niveaux d'uranium, qui ont été lixiviés des résidus dans l'aquifère. De ce fait, une biostimulation *in situ* de bactéries réductrices de métaux dans ces eaux a été réalisée par injection d'acétate (donneur d'électrons). Après 50 jours, une diminution de la concentration en uranium dans ces eaux a été observée, avec une augmentation de la concentration en fer (II) et l'enrichissement en *Geobacter* (espèce ferro-réductrice connue). Les avantages d'une bioremédiation *in situ* sont que l'uranium est immobilisé sur place, sans exposition en surface, les donneurs d'électrons utilisés dans la biostimulation sont généralement peu coûteux, et il n'est pas nécessaire d'utiliser des microorganismes non indigènes (Selvakumar et al., 2018). Cependant la stabilité à long terme des phases minérales formées est cruciale pour le succès de la biorestauration d'un site. Or, les minéraux d'uraninite formés sont connus pour être moins stables et facilement oxydables en forme U(VI) mobile par l'oxygène ou le nitrate (Huang et al., 2017 ; Kolhe et al., 2018). Par conséquent, le potentiel de réoxydation de l'U(IV) doit être pris en compte lorsqu'il s'agit de décider si la bioréduction constitue une stratégie de biorestauration à long terme pour éliminer l'U(VI) des eaux souterraines (Newsome et al., 2014).

D'autre part, l'immobilisation de l'uranium sous forme de minéraux de phosphate d'uranyle a également été étudiée pour la bioremédiation *in situ*, en particulier pour les sites où la bioréduction pourrait être irréalisable en raison de concentrations élevées de nitrates ou lorsqu'il existe un risque de réoxydation (Newsome et al., 2014). De plus, contrairement à la bioréduction de l'uranium qui nécessite des conditions anaérobies, la biominéralisation peut être réalisée en condition aérobie, ce qui rend ce processus intéressant pour la décontamination d'uranium dans des eaux souterraines contaminées oxygénées (Beazley et al., 2007). Par conséquent, la bioremédiation d'environnements contaminés en uranium par ce processus de biominéralisation semble prometteuse mais nécessite d'être approfondie par des études complémentaires.

Partie D : Objectifs de la thèse

Les objectifs principaux de cette thèse sont : (1) de caractériser les communautés bactériennes de différentes sources minérales naturellement radioactives (NORM), ainsi que le long d'une carotte de sol prélevée dans une zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin (TENORM) qui est marquée par un horizon de sol défini par de fortes concentrations en radioéléments (dont l'uranium) dû aux activités minières ; (2) de discriminer l'influence des radioéléments, par rapports aux autres paramètres physicochimiques, sur la structuration des communautés bactériennes dans ces deux sites ; (3) d'évaluer la capacité de souches isolées de ces deux sites à interagir avec l'uranium, afin de déterminer l'effet de ces bactéries sur la mobilité et biodisponibilité de cet élément dans l'environnement.

Pour ce faire, nous avons échantillonné des sédiments de différentes sources minérales aux conditions physicochimiques variées, et caractérisé les communautés bactériennes par une approche de métabarcoding. Ce travail décrit pour la première fois les communautés bactériennes des sédiments de sources minérales caractérisées par de fortes concentrations en radioéléments d'origine naturelle. Ces communautés bactériennes étant exposées à des niveaux élevés de radioactivité naturelle et chronique sur de très longues périodes, il est apparu intéressant d'observer si des communautés spécifiques s'y sont développées grâce à des fonctions particulières. En parallèle, nous avons échantillonné trois horizons de sol de la carotte prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin, dont un horizon était marqué par de fortes concentrations en uranium. Les communautés bactériennes de ces trois horizons ont également été caractérisées par une approche de métabarcoding. Bien que plusieurs études aient travaillé sur la caractérisation des communautés bactériennes dans un contexte minier d'uranium, très peu se sont intéressées aux environnements à l'aval de ces sites miniers. Ce travail permettra d'observer si des populations bactériennes sont spécifiques en présence de fortes concentrations en radioéléments, en particulier dans la couche marquée par de fortes concentrations en uranium due aux activités minières, et si elles pourraient intervenir dans les processus de spéciation et de mobilité de l'uranium dans cette zone humide.

De plus, que ce soit dans les sources minérales ou le long de la carotte de sol, plusieurs paramètres environnementaux ont été mesurés permettant d'identifier quels sont les paramètres qui contribuent le plus à la structuration des communautés bactériennes. En particulier, cela permettra d'observer si les radioéléments d'origine naturelle (NORM) ou naturelle renforcée (TENORM), par rapport aux autres paramètres environnementaux, sont des « drivers » de la composition des communautés bactériennes dans ces deux sites.

Enfin, dans la littérature, les souches bactériennes étudiées pour leur capacité à interagir avec l'uranium proviennent généralement de sites enrichis ou contaminés en uranium. De ce fait, les bactéries isolées de ces deux sites présentent un fort potentiel pour interagir avec l'uranium. La description de ces mécanismes permettrait de mieux comprendre comment les souches présentes dans ces deux sites d'études sont adaptées à ces environnements extrêmes caractérisés par de fortes concentrations en uranium.

Chapitre 2 : Sites de prélèvement et Méthodes

Ce deuxième chapitre est consacré à la description des sites d'études et aux protocoles expérimentaux mis en œuvre pour collecter les échantillons d'eau et sédiments dans les sources minérales naturellement radioactives, et de sol dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin. Les méthodes utilisées pour analyser les communautés bactériennes dans ces échantillons seront passées ici en revue, ainsi que le traitement des données. Par ailleurs, les méthodes employées pour l'exposition des bactéries à l'uranium seront également détaillées dans cette partie.

I- Description des sites d'études

1) Sources minérales radioactives dans le Massif Central en Auvergne

a) Description des sources minérales

Le premier site échantillonné dans le cadre de cette thèse sont des sources minérales naturellement chargées en radioéléments. Les sources minérales étudiées sont situées dans le Massif Central en Auvergne (France). Ce massif est une région volcanique constituée de formations géologiques riches en uranium où de nombreuses sources minérales naturellement radioactives ont été recensées (Beaucaire et al., 1986 ; Ielsch et al., 2017 ; Risler, 1974). Parmi ces sources, certaines ont été conservées dans leur forme originelle et naturelle alors que d'autres ont été modifiées par l'homme. En effet, certaines de ces sources étaient utilisées à la période gallo-romaine à des fins thérapeutiques, ou de nos jours à des fins industrielles et commerciales (exemple de l'eau minérale de Vichy Célestins® prélevée dans la source de Vichy). De manière générale, ces sources minérales naturellement radioactives peuvent être décrites comme des écosystèmes isolés avec des propriétés physicochimiques variées présentant des niveaux élevés en minéraux et radionucléides par rapport à leur environnement. Ces minéraux et radionucléides dans ces sources proviennent de l'altération chimique des roches de la croûte terrestre, dont des roches granitiques riche en uranium de cette région, par des eaux souterraines qui vont se charger en minéraux, mais également en ^{238}U , ^{232}Th et ^{235}U , ainsi que leurs descendants radioactifs. Ces eaux remontent ensuite sous l'effet de la pression

hydrostatique ou gazeuse, avec différents éléments majeurs et traces, jusqu'à l'émergence. Par conséquent, leur hydrochimie reflète la lithologie de l'aquifère.

De par leurs niveaux élevés en minéraux, et principalement en radioéléments, ces sources minérales représentent des environnements extrêmes pour la biosphère qui y vit. Ces organismes vivants qui peuplent ces sources minérales sont exposés depuis des milliers d'années à ces radioéléments, pouvant entraîner une évolution et une adaptation de cette biosphère à ces conditions. Ces sources minérales, qui s'inscrivent dans un contexte NORM (Naturally Occuring Radioactive Materials), constituent donc des milieux intéressants pour étudier l'influence de la minéralisation et de la radioactivité naturelle sur la biodiversité. Dans ce contexte, le projet TIRAMISU (BiodiversiTy In RAdioactive MIneral SoURces, porté par Vincent Breton, LPC), au sein de la ZATU (Zone Atelier Territoires Uranifères) a été élaboré afin de caractériser la biodiversité ainsi que les adaptations développées par ces microorganismes dans ces milieux définis par une radioactivité naturelle, ancienne et chronique. En particulier, un des objectifs de ce projet est d'étudier et comprendre les effets des radioéléments (radiation / toxicité chimique) sur les communautés microbiennes d'une gamme variée de sources minérales naturellement radioactives dans le Massif Central français (Auvergne).

Dans le cadre de cette thèse, cinq sources ont été sélectionnées pour les analyses des communautés bactériennes par métabarcoding dans les sédiments de ces sources : Bard (B2), Graviers (GR), Dourieux (DO), Montagne (M1) et 3 Sauts (LE). Ces sources ont été choisies car elles présentaient un important gradient de conditions physicochimiques, dont les concentrations en radioéléments. Deux sources supplémentaires ont été sélectionnées pour l'isolement de souches bactériennes : Mariol (MA) et Salins (SA). Ces deux sources ont été ajoutées du fait qu'elles présentaient des concentrations en radioéléments élevées dans l'eau par rapport aux autres sources (principalement en radium 226 pour la source de Mariol et en uranium 238 pour la source de Salins). Il aurait été intéressant d'étudier les sources de Mariol et Salins en métabarcoding, mais ces sources ont été aménagées par l'homme et ne présentent pas de sédiments. La localisation des sources est indiquée sur la carte (Figure 9) ci-dessous.

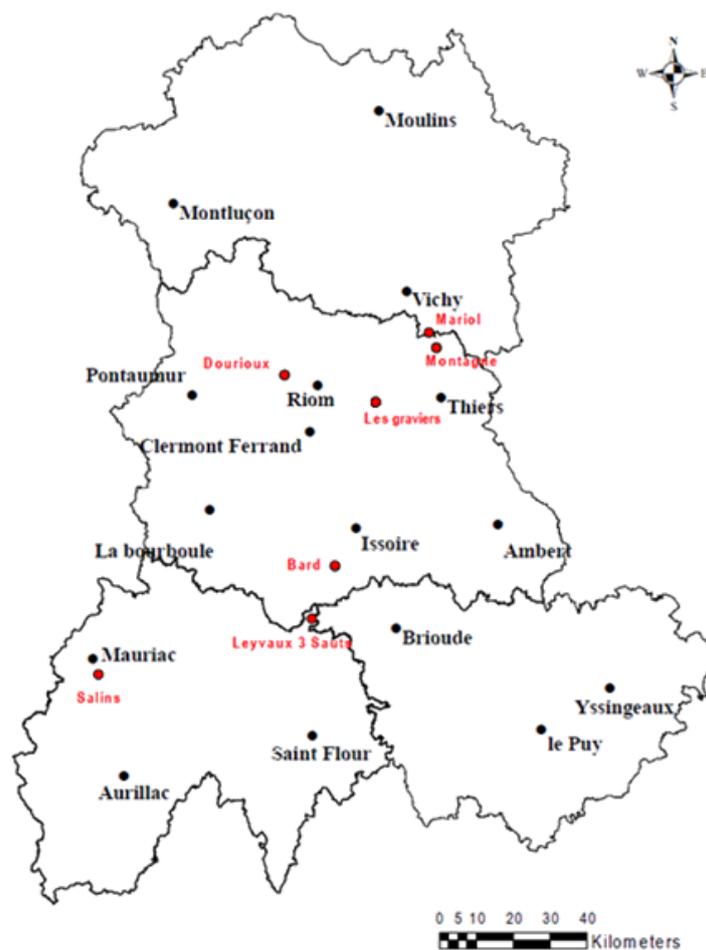


Figure 9 : Localisation géographique des 7 sources minérales sélectionnées (Bard, Graviers, Dourioux, Montagne, Mariol, 3 Sauts et Salins) dans le Massif Central (Auvergne)

La source de Graviers (Figure 10.a) se situe dans la commune de Joze (Puy-de-Dôme) et prend sa source dans le centre de la faille de la Limagne. Cette source émerge des sédiments oligocènes et est riche en bicarbonate, sodium, calcium et magnésium (Risler, 1974).

La source de Montagne est située dans la commune de Châteldon (Puy-de-Dôme) dans le bassin de Saint Yorre. L'eau de la source est prélevée de l'émergence et déversée à faible débit dans un ancien bâtiment construit pendant la période d'embouteillage (XIX^{ème} – XX^{ème} siècle) (Figure 10.f). Une des particularités de cette source est qu'elle est connue comme étant une des sources les plus radioactives de France (Risler, 1974). D'autre part, la source de Mariol est située dans la ville de Mariol (Allier), à 5km de Châteldon et fait partie du bassin sud de Vichy. L'eau de cette source jaillit dans une vasque à environ 1m du sol (Figure 10.c). Ces deux sources sont riches en bicarbonate et en sodium et prennent leur source dans les failles de la

frontière orientale de la Limagne (Risler, 1974). Néanmoins la source de Montagne est caractérisée par une teneur en minéraux plus faibles que d'autres sources dans la région (Risler, 1974).

La source de Dourieux (Figure 10.d) se situe dans la commune de Charbonnières-les-Varennes (Puy-de-Dôme), près de la ville de Chatel-Guyon, dans la faille occidentale de la Limagne. Des prospections avaient mis en évidence de nombreuses zones radioactives dans cette région, dont la présence de tobernite près du hameau de Dourieux. Un aménagement en pierre protège l'émergence de cette source (Alsac et al., 1988).

La source de Bard se situe à proximité du hameau de Bard, dans la ville de Boudes (Puy-De-Dôme) (Figure 10.b), alors que la source de 3 Sauts (Figure 10.g) est située dans la commune de Leyvaux (Cantal). Ces deux sources sont situées dans la zone du Cézallier ; le socle de cette région est principalement composé de roches métamorphiques. Ces sources sont des eaux hydrothermales salines et carbo-gazeuses, plutôt neutres (pH 6-7) et ne sont pas en équilibre avec la pression du CO₂ atmosphérique. Leur composition chimique est riche en chlore, sodium, bicarbonate, calcium, fer, aluminium, phosphate et en oligo-éléments (arsenic, sélénium) (Beucaire et al., 1987, Fouillac 1983 ; Négrel et al., 2000).

Enfin, la source de Salins est située dans la commune d'Apcher (Cantal), et a été découverte récemment à l'occasion de sondages effectués pour la recherche de minerais. Cette source aménagée est caractérisée par une eau assez peu minéralisée qui s'écoule d'un robinet à faible débit qui est directement connecté à l'émergence de cette source (Figure 10.e).



Figure 10 : Photos des 7 sources échantillonnées dans le Massif Central (Auvergne, France) en octobre 2019 et juin 2020 : a) Graviers; b) Bard; c) Mariol; d) Dourieux; e) Salins; f) Montagne; g) 3 Sauts

b) Echantillonnage des sources minérales

Pour l'étude des communautés bactériennes par métabarcoding, deux campagnes de prélèvement ont été réalisées pour échantillonner les cinq sources minérales radioactives (Bard, Graviers, Montagne, Dourieux et 3 Sauts). La première campagne a eu lieu en octobre 2019 et la deuxième campagne a eu lieu en juin 2020. Lors de chaque campagne, pour chacune des sources, du sédiment a été prélevé et mis dans des tubes Falcon® stériles. Chaque prélèvement a été réalisé en triplicata pour chaque source. Ces flacons ont été ensuite stockés dans de l'azote liquide pour le transport, puis conservés à -80°C jusqu'à analyse.

Pour l'isolement des souches bactériennes présentes dans ces sources, 7 sources ont été échantillonnées (Bard, Graviers, Montagne, Dourieux, 3 Sauts, Salins et Mariol). Les sources de Bard, Graviers, Montagne, Dourieux, 3 Sauts, et Mariol ont été échantillonnées en octobre 2019, alors que la source de Salins a été échantillonnée en septembre 2020. Pour chaque source, un prélèvement d'eau a été effectué en triplicata dans des tubes Falcon® stériles. Si cela était possible, les tubes ont été ouverts sous l'eau pour les remplir puis refermés. Sinon, les tubes ont été remplis directement à la « fontaine » ou à l'aide d'une seringue stérile.

Enfin pour les analyses physico-chimiques, des prélèvements d'eau ont été effectués pour chaque source, lors de chaque campagne. Pour cela, après rinçage d'un flacon de 150ml trois fois avec l'eau de source, l'eau a été prélevée soit par remplissage en ouvrant le flacon sous l'eau, soit à l'aide d'une seringue. Des prélèvements de sédiments ont également été effectués pour l'analyse des paramètres physico-chimiques dans chaque source étudiée pour les deux campagnes de prélèvement.

c) Caractérisation physico-chimique des sources minérales échantillonnées

Dans le but de caractériser au mieux les profils physico-chimiques des sources, divers paramètres ont été mesurés par plusieurs équipes de la collaboration TIRAMISU, dans l'eau et les sédiments, pour chaque réplique échantillonnée dans ces sources. La température de l'eau (°C), la conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$) et l'oxygène dissous (%) ont été mesurés *in situ* à l'aide d'une sonde multi-paramètres (WTW FC 340i) et d'une sonde à oxygène (Ysi ProODO). La concentration en carbonates a été mesurée à l'aide d'un kit carbonate Hach.

Les concentrations en éléments majeurs dans les échantillons d'eaux ont été mesurées par une technique de chromatographie ionique à haute pression (Thermo Scientific Dionex

Aquion), après une filtration de ces échantillons (Filtres Whatmann GF/C). Les ions majeurs mesurés sont (en mg/l) : lithium (Li^+), sodium (Na^+), ammonium (NH_4^+), potassium (K^+), magnésium (Mg^{2+}), calcium (Ca^{2+}), fluor (F^-), chlore (Cl^-), nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-), phosphate (PO_4^{3-}) et sulfate (SO_4^{2-}) (GEOLAB, Clermont-Ferrand). Les métaux à l'état de traces (chrome (Cr), manganèse (Mn), fer (Fe), nickel (Ni), cuivre (Cu), arsenic (As), rubidium (Rb), strontium (Sr), césium (Cs), baryum (Ba) et plomb (Pb)), ainsi que les radioéléments (uranium 238 (^{238}U), thorium 232 (^{232}Th), Radium 226 (^{226}Ra)) ont également été quantifiés dans ces échantillons d'eaux, par ICP-MS Quad (modes torche chaude et chambre de collision) et ICP-MS HR (uniquement pour le ^{226}Ra) après filtration (filtres PTFE 0,45 μm , tulipe filtration en polysulfone, pompe à vide à jet d'eau) et acidification (en milieu HNO_3 0,65%) (Subatech, Nantes). Enfin, l'activité du radon 222 (^{222}Rn) (Bq/l) dans l'eau a été mesurée par spectroscopie γ , après prélèvement dans des béciers scellés (Marinelli). Un détecteur de type puits en germanium de haute pureté (HPGe) d'une efficacité relative de 35% couplé au logiciel d'analyse gamma Genie2000 a été utilisé pour l'analyse au LPC (Clermont Ferrand, France). Pour la détermination de l'activité ^{222}Rn , la raie γ de 352 keV de ^{214}Pb ($t_{1/2} = 27,06$ min) a été considérée sous l'hypothèse d'un équilibre séculaire.

Les échantillons de sédiments ont également été caractérisés chimiquement et radiologiquement. Tout d'abord, des analyses chimiques classiques ont été réalisées afin de mesurer la quantité de carbone organique total (COT en g(C)/kg), d'azote total (N tot en g/kg), d'hydrogène total (H tot en g/kg), de soufre total (S tot en g/kg) et de carbone total (C tot en g/kg) (Société INOVALYS, Nantes, accréditation COFRAC). Ensuite, les métaux traces (Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, As, Rb, Sr, Cs, Ba, Pb, Th et U) ont été quantifiés par ICP-MS Quad, après minéralisation des échantillons et filtration (filtres seringue PTFE hydrophilisé 0,2 μm) (Subatech, Nantes). Enfin, l'activité des radioéléments (^{238}U , ^{226}Ra , ^{210}Pb , ^{212}Pb , ^{228}Ac , ^{137}Cs) a été analysée par spectrométrie gamma, après que les échantillons aient été tamisés à 2mm, puis séchés à 105°C pendant au moins 24 heures (Subatech, Nantes).

Suite à des problèmes lors de l'échantillonnage en juin 2020 pour la source de 3 Sauts, les paramètres physicochimiques de cette source n'ont pas pu être caractérisés. Les mesures physico-chimiques des sources étudiées dans le cadre des analyses des communautés bactériennes par métabarcoding (chapitre 3), dans l'eau et les sédiments sont rapportées dans les Tableau 4 et Tableau 5 ci-dessous :

Tableau 4 : Concentrations en COT (g(C)/Kg), en CHNS totale (g/kg), en métaux traces ($\mu\text{g/g}$ excepté pour Fe en mg/g), ainsi que l'activité des radioéléments (en Bq/g) mesurée dans les échantillons de sédiments pour chaque site lors des campagnes d'octobre 2019 et juin 2020

Sources	Saison	Mn ($\mu\text{g/g}$)	Cu ($\mu\text{g/g}$)	As ($\mu\text{g/g}$)	Rb ($\mu\text{g/g}$)	Sr ($\mu\text{g/g}$)	Ba ($\mu\text{g/g}$)	Pb ($\mu\text{g/g}$)	Th ($\mu\text{g/g}$)	U ($\mu\text{g/g}$)	Cr ($\mu\text{g/g}$)	Ni ($\mu\text{g/g}$)	Fe (mg/g)	²²⁶ Ra (Bq/g)	²¹⁰ Pb (Bq/g)	²²⁸ Ac (Bq/g)	²¹² Pb (Bq/g)	COT (g(C)/kg)	N tot (g/kg)	H tot (g/kg)	S tot (g/kg)	C tot (g/kg)
Bard	Octobre 2019	333,07	40,47	310,48	111,72	795,02	1316,00	45,80	4,48	0,73	42,67	29,18	84,62	2,19	1,25	0,67	1,10	193,00	10,53	31,59	5,16	226,00
	Juin 2020	246,34	12,20	24,73	111,54	490,84	465,20	22,16	1,94	0,68	-	-	26,61	0,21	0,11	0,19	0,17	172,00	9,36	24,53	3,36	180,00
Dourioux	Octobre 2019	571,17	0,07	102,70	65,77	62,97	95,95	72,25	9,67	16,12	0,07	25,77	25,68	0,60	1,44	0,11	0,09	78,00	10,75	21,19	4,44	124,00
	Juin 2020	614,58	43,58	145,49	44,97	36,98	74,31	52,78	6,34	21,48	-	-	16,96	0,76	2,59	0,07	0,07	104,00	10,52	20,36	2,99	123,00
Graviers	Octobre 2019	390,91	5,64	5426,25	63,34	802,33	475,66	13,60	4,24	1,85	21,42	10,56	123,06	26,73	3,15	17,97	9,77	53,00	8,54	17,19	12,55	111,00
	Juin 2020	415,02	4,94	2442,69	36,62	873,52	279,45	10,65	2,21	1,48	-	-	90,51	25,47	2,50	10,59	4,98	61,00	6,62	13,38	8,13	123,00
3 Sauts	Octobre 2019	529,94	0,02	40598,80	31,80	896,41	429,34	6,52	0,33	0,23	0,01	1,83	165,27	2,08	2,94	1,14	0,66	87,00	7,57	17,24	5,15	147,00
	Juin 2020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Montagne	Octobre 2019	1251,00	13,25	2848,89	48,34	233,22	627,35	111,82	11,70	5,33	19,26	7,71	113,29	8,61	8,06	0,84	0,56	93,00	8,92	24,15	3,88	205,00
	Juin 2020	1413,31	13,15	3415,32	21,57	340,73	1145,16	73,99	7,00	5,95	-	-	222,98	20,56	6,39	2,03	0,38	27,00	1,32	22,11	1,70	60,00

Tableau 5 : Variables physico-chimiques (conductivité, température, oxygène dissous, pH, ions majeurs, métaux traces et radioéléments) mesurées dans les échantillons d'eaux pour chaque site lors des campagnes d'octobre 2019 et juin 2020

Source	Saison	²²² Rn (Bq/l)	Mn (µg/l)	Sr (µg/l)	Ba (µg/l)	Li ²⁺ (mg/l)	Na ⁺ (mg/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)	K ⁺ (mg/l)	Mg ²⁺ (mg/l)	Ca ²⁺ (mg/l)	F ⁻ (mg/l)	Cl ⁻ (mg/l)	NO ₂ ⁻ (mg/l)	Br ⁻ (mg/l)	NO ₃ ⁻ (mg/l)	PO ₄ ³⁻ (mg/l)	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	HCO ₃ ⁻ (mg/l)	Conductivité (µS/cm)	pH	O ₂ (%)	T (°C)
Bard	Octobre 2019	10,00	508,00	4090,00	278,00	5,20	1028,88	0,47	185,88	136,02	233,76	0,87	702,07	0,02	1,88	0,21	0,12	34,03	3012,00	6380,00	6,81	3,10	14,70
	Juin 2020	4,90	463,00	3880,00	209,50	4,98	974,68	1,15	184,06	126,87	223,32	0,80	680,38	0,02	1,71	0,12	0,19	30,25	2810,00	6180,00	7,22	2,90	15,50
Dourieux	Octobre 2019	3110,00	11,60	173,20	19,80	0,02	12,28	0,01	4,47	7,67	21,63	0,10	16,53	0,02	0,02	17,74	0,57	17,47	85,00	255,00	6,73	10,10	10,70
	Juin 2020	3852,00	11,40	180,00	13,10	0,01	12,32	0,01	9,19	8,43	24,77	0,12	12,89	0,01	0,01	12,21	0,43	12,85	130,00	246,00	6,35	22,90	10,70
Graviers	Octobre 2019	37,50	518,00	3360,00	67,70	4,16	823,10	0,67	159,59	102,66	381,87	0,64	739,44	0,02	1,66	0,63	0,13	134,40	2730,00	5430,00	6,69	19,50	14,40
	Juin 2020	29,20	520,00	3410,00	68,40	4,12	808,63	1,63	162,59	111,50	424,36	0,60	792,79	0,03	1,65	0,33	0,37	124,42	2510,00	6360,00	7,48	30,80	15,90
3 Sauts	Octobre 2019	321,60	426,00	1660,00	33,20	5,41	803,89	0,06	69,23	39,31	135,35	0,86	319,64	0,01	0,89	0,71	0,06	178,05	1940,00	3890,00	6,66	12,80	13,10
	Juin 2020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Montagne	Octobre 2019	3452,50	47,50	296,00	47,10	0,24	56,21	0,06	5,15	5,49	67,46	0,86	3,48	0,03	0,06	17,66	0,30	8,40	340,00	693,00	6,54	6,80	12,50
	Juin 2020	3746,40	1296,00	1070,00	260,00	1,00	182,31	0,02	18,85	21,26	261,04	1,60	3,70	0,02	0,04	0,05	0,07	13,30	1400,00	1702,00	6,32	4,6	12,20

Les paramètres physico-chimiques des échantillons d’eaux des 7 sources échantillonnées, dont en particulier les concentrations et activités en radioéléments, sont résumées dans le Tableau 6 ci-dessous :

Tableau 6: Principaux paramètres physico-chimiques mesurés dans l'eau des sources échantillonnées en octobre 2019. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type ($n=3$). LD = Limite de détection ; / = mesure non effectuée

Source	^{238}U (ppb)	^{226}Ra (ppq)	^{222}Rn (Bq/l)	Conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH	O_2 dissous (%)	Température ($^{\circ}\text{C}$)
Salins	15,91 \pm 0,73	20 \pm 11	/	3090	6,83	2,05	13,3
Montagne	3,71 \pm 0,25	< LD	3452,5 \pm 16,7	693	6,54	0,65	12,5
Mariol	0,99 \pm 0,11	58 \pm 10	138,8 \pm 0,6	811	6,44	0,41	17,4
Dourieux	0,66 \pm 0,11	/	3110,0 \pm 9,0	255	6,73	1,12	10,7
3 Sauts	0,5 \pm 0,12	/	321,6 \pm 1,7	3890	6,66	1,35	13,1
Bard	< LD	25 \pm 9	10,0 \pm 0,2	6380	6,81	0,32	14,7
Graviers	< LD	64 \pm 20	37,5 \pm 0,2	5430	6,69	2	14,4

Brièvement, les concentrations en uranium dans ces sources variaient fortement entre elles, avec la source de Salins qui possède la concentration la plus élevée (15,91 $\mu\text{g}/\text{l}$). Pour 5 sources (Salins, Montagne, Mariol, Dourieux et 3 Sauts), les valeurs de concentrations sont supérieures au fond géochimique des eaux de rivières estimé à 0,44 $\mu\text{g}/\text{l}$ dans les zones sédimentaires et 0,15 $\mu\text{g}/\text{l}$ dans les zones de socle hercynien et alpin (Salpeteur et Angel, 2010). De plus ces isotopes radioactifs vont, par désintégrations radioactives spontanées, produire des descendants radioactifs dont en particulier le ^{226}Ra et ^{222}Rn . En particulier, la concentration en radon dans l’eau des sources de Dourieux et Montagne est très élevée par rapport aux autres sources étudiées.

2) Ancien site minier de Rophin

a) Description du site et des projets associés

Le deuxième site étudié, dans le cadre de cette thèse, est l'ancien site minier de Rophin situé dans la chaîne du Forez dans le département du Puy de Dôme, près de la ville de Lachaux (Figure 11.a) qui faisait partie de plusieurs mines référencées comme gisements de « l'ouest de Lachaux » (Figure 11.b) (Martin et al., 2020). Cette région est apparue intéressante pour l'exploitation d'uranium du fait de la prédominance de minerais d'uranium exploitables tels que la parsonsite ($\text{Pb}_2(\text{UO}_2)(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), l'autunite ($\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 8-12 \text{H}_2\text{O}$) et la tobernite ($\text{Cu}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Martin et al., 2020). Les principaux événements de l'exploitation d'uranium dans la mine de Rophin sont résumés dans une frise chronologique (Figure 11.c).

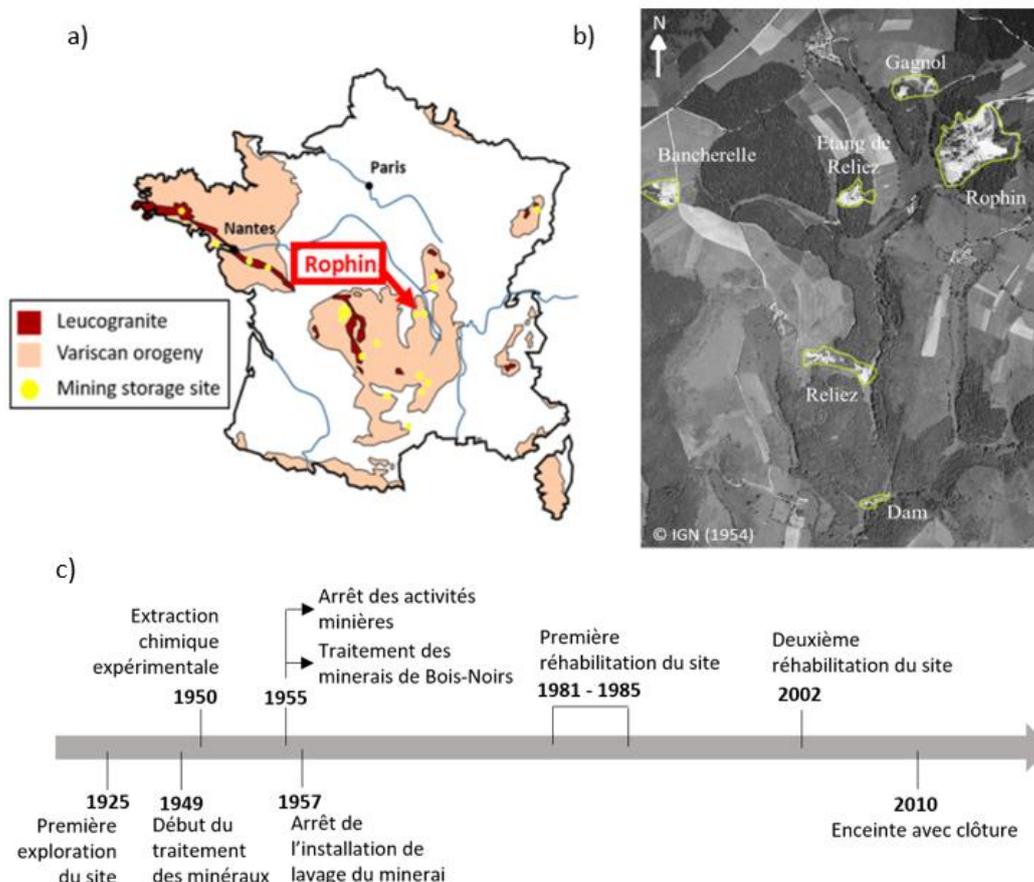


Figure 11 : a) Localisation du site de Rophin ; b) Vue d'ensemble du bassin versant de Rophin en 1954 avec les différentes extractions de gisement d'uranium à proximité ; c) Chronologie des opérations de la mine de Rophin (Martin et al., 2020)

Pour traiter les matériaux extraits dans la région de Lachaux, une usine de lavage a été construite à côté de la mine de Rophin, où étaient traités les minerais d'uranium par gravimétrie avec une table vibrante, des machines de concassage et un circuit de flottation qui comprenait 3 bassins de décantation pour retenir les particules d'uranium. Environ 2000 tonnes de minerais ont été extraits durant la période d'activité de la mine. Les résidus de traitement de la laverie (environ 30 000t) ont été entreposés sur place et constituent aujourd'hui un site de stockage de résidus d'uranium classé ICPE (Installation Classée pour la Protection de l'Environnement), dont la surveillance est sous la responsabilité d'ORANO (Figure 12).

Aujourd'hui, une végétation forestière recouvre les résidus miniers et les effluents d'eaux périodiques des galeries souterraines sont collectés dans une tranchée qui rejoint le ruisseau « le Gourgeat » qui s'écoule dans le bassin versant et la zone humide en aval de la zone de stockage. Ce site de stockage de Rophin, et son environnement immédiat sont devenus des sites expérimentaux de la Zone Atelier Territoires Uranifères (ZATU, CNRS) depuis 2015. Une première étude (Martin et al., 2020), combinant plusieurs approches complémentaires (étude historique du site, gammagraphie radiologique du bassin versant, analyse de carottes de sol (concentrations en métaux et datation) et dendroanalyse) a été réalisée pour évaluer et comprendre l'importance et l'origine de la contamination de cette zone humide autour du site de Rophin. Les résultats de l'étude par gammagraphie montrent une contamination dans le bassin versant en aval (en particulier dans la zone humide) par rapport à l'amont (Figure 12) (Martin et al., 2020). Ces résultats sont confirmés par les concentrations élevées d'uranium mesurées dans des carottes de sol prélevées en aval du site, en particulier dans une couche de sol limoneux blanchâtre située à une profondeur d'environ 10-30 cm (1855-3560 mg/kg U). De plus, la datation des carottes de sol confirme que le dépôt de cette couche chargée en uranium est daté entre 1950 et 1960, ce qui est en accord avec la fin des activités minières (1957). Enfin, une analyse isotopique du plomb a permis de bien valider l'origine minière de l'uranium dans cette couche de sol blanchâtre. Par conséquent, ces observations ont conduit les auteurs à supposer que la contamination dans cette couche de sol peut être attribuée à une distribution diffuse de radionucléides provenant de l'exploitation minière. En particulier cette contamination était due au mauvais fonctionnement et au manque d'entretien des bassins de décantation, qui ont entraîné la libération de particules minérales d'uranium transportées par l'eau (lors d'évènements d'inondation) et le dépôt de cette couche de sol blanchâtre chargée en uranium dans la zone humide.

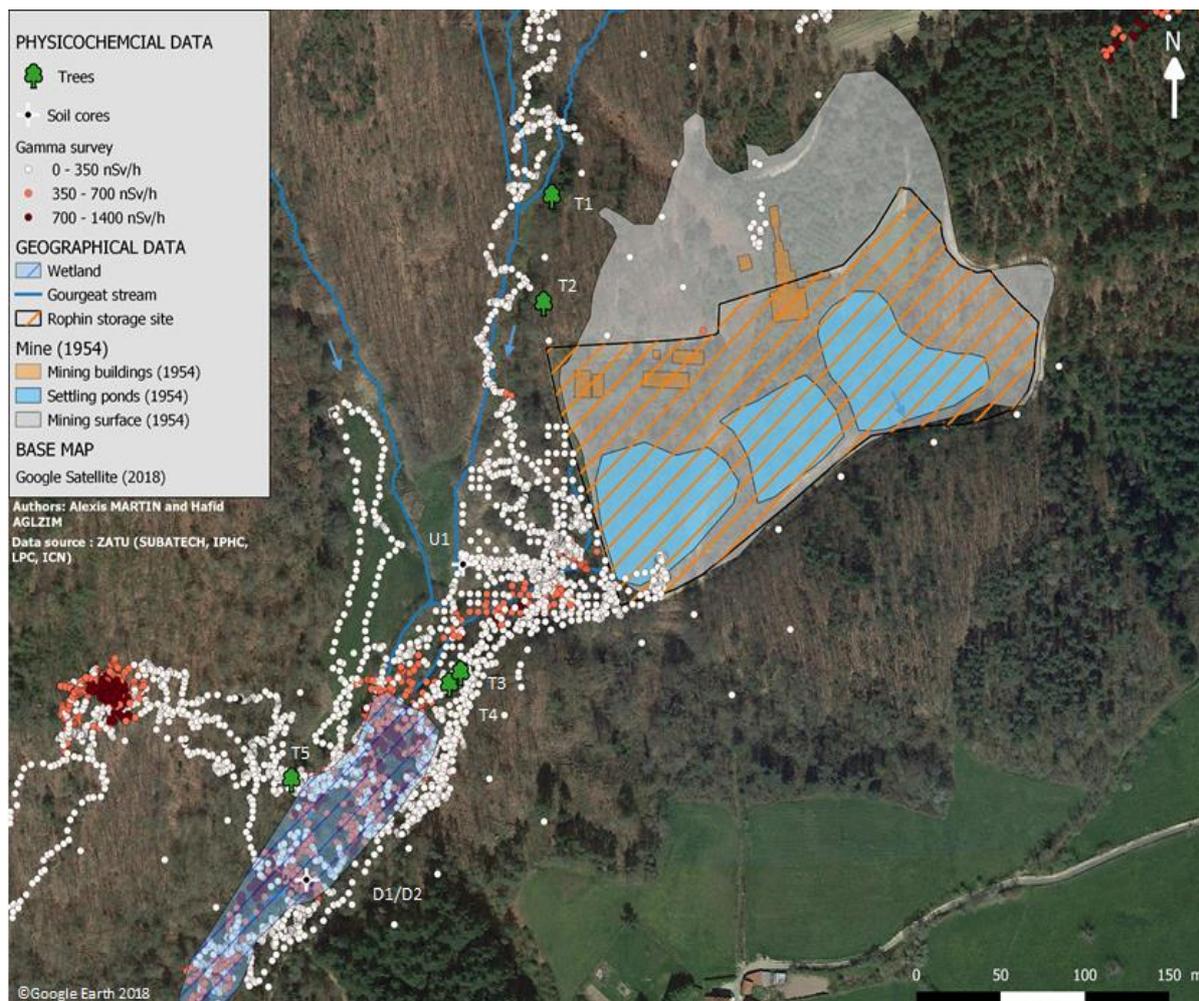


Figure 12 : Vue d'ensemble du bassin versant du Rophin en 2018, avec les emplacements des points de mesure des relevés gamma, de la zone humide à l'aval du site minier, des installations minières en 1954 et du site de stockage des résidus miniers (ICPE) (Martin et al., 2020).

Cependant, de nombreuses questions subsistent concernant le mode de transport, le comportement migratoire, la biodisponibilité et l'impact des radionucléides dans cette zone en aval de l'ancien site minier sur la biodiversité, et plus précisément sur les communautés microbiennes. Dans ce contexte, une première étude a été réalisée en 2017-2018 sur le ruisseau « le Gourgeat », situé à l'aval de l'ancien site minier, recevant les eaux d'exhaure du site ICPE et dont les sédiments contenaient jusqu'à 136,7 $\mu\text{g/g}$ d'uranium (Projet TREMPIN, porté par Clarisse Mallet, LMGE Clermont-Ferrand, et financé par NEEDS : Etude de l'impact des radionucléides sur la diversité microbienne autour de l'ancien site minier de Rophin). L'objectif de cette étude était de déterminer si une contamination chronique depuis plusieurs décennies à de faibles concentrations biodisponibles en radionucléides et éléments traces métalliques ($< 100\text{mg/kg}$) avait un impact sur la diversité et la composition microbiennes des sédiments du

ruisseau « le Gourgeat » situé à l’aval de l’ancien site minier d’uranium. A cette fin, quatre points de prélèvements d’eau et de sédiments (Point témoin, Point 1, Point 3 et Point 5) avaient été collectés le long de ce ruisseau pour des analyses biologiques et physicochimiques (Figure 13). Brièvement, cette étude avait démontré que la composition de la communauté microbienne, plutôt que la diversité, était significativement affectée par les contaminations à long terme aux éléments traces métalliques (cuivre, plomb et zinc) et aux radionucléides (uranium, radium et polonium) le long de ce ruisseau (Mallet et al., 2023 – en préparation).

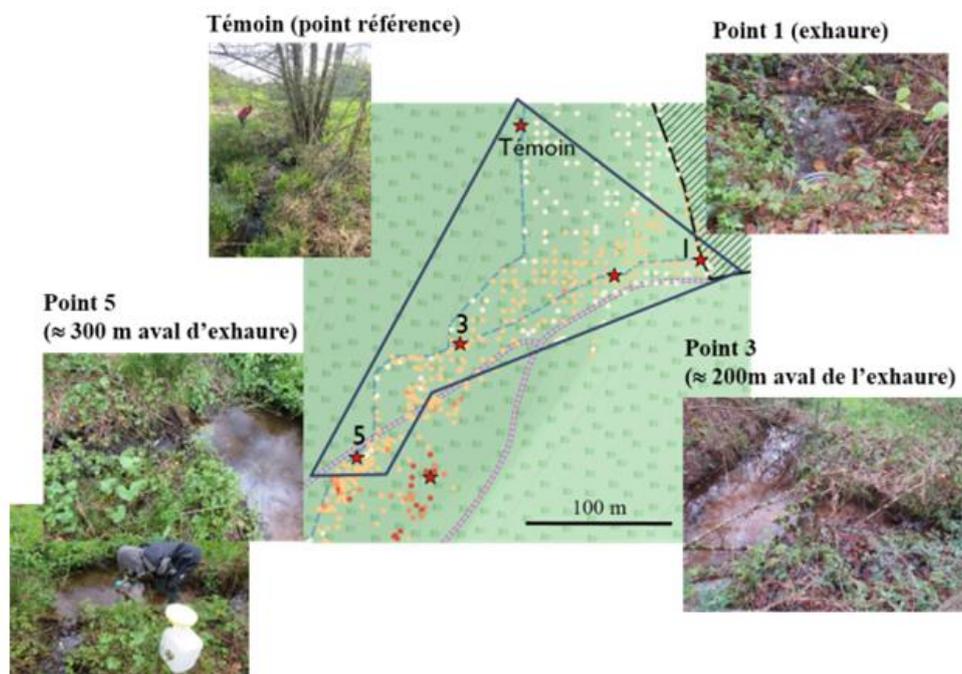


Figure 13 : Carte et photos des différents points échantillonnés dans le ruisseau « le Gourgeat » situé à l’aval de l’ancien site minier d’uranium de Rophin

Dans la continuité des études physico-chimiques et biologiques menées au sein de la ZATU portant sur les environnements situés à l’aval de l’ancien site minier de Rophin, le projet INSPECT (INteractions, Spéciation et Effets des radionuCléides (U, Th, Ra, Po) d’une zone humide anThropisée), porté par Mireille del Nero (IPHC Strasbourg) a été élaboré (et financé par NEEDS comme projet structurant 2020-2022) dans le but de mieux comprendre les interactions, les transferts et les effets des radionucléides, à savoir l’uranium, le thorium, le polonium 210 et le radium 226, dans la zone humide située à l’aval de l’ancien site minier de Rophin. Cette zone humide présente un fort intérêt du fait qu’elle s’inscrit dans un contexte TENORM (Technologically Enhanced Naturally Occuring Radioactive Material), étant située

à l'aval de l'ancien site minier de Rophin (Figure 14). Comme décrit précédemment, cette zone humide est caractérisée par la présence d'un horizon du sol défini par de fortes concentrations en radionucléides, dont l'origine est le transport et l'accumulation de particules fines argileuses provenant du débordement des bassins de décantation associés aux anciennes activités minières. De plus, cette zone humide est une zone d'échange potentiel entre les différents continuum biosphère terrestre-sol-eau, entraînant des interactions élevées entre les radionucléides présents dans le profil du sol de la zone humide et les organismes de premiers niveaux de la chaîne trophique (microorganismes et plantes). Par conséquent, ce site apparaît pertinent pour évaluer l'incidence des activités anthropiques sur le devenir des radionucléides et les interactions avec la biosphère.

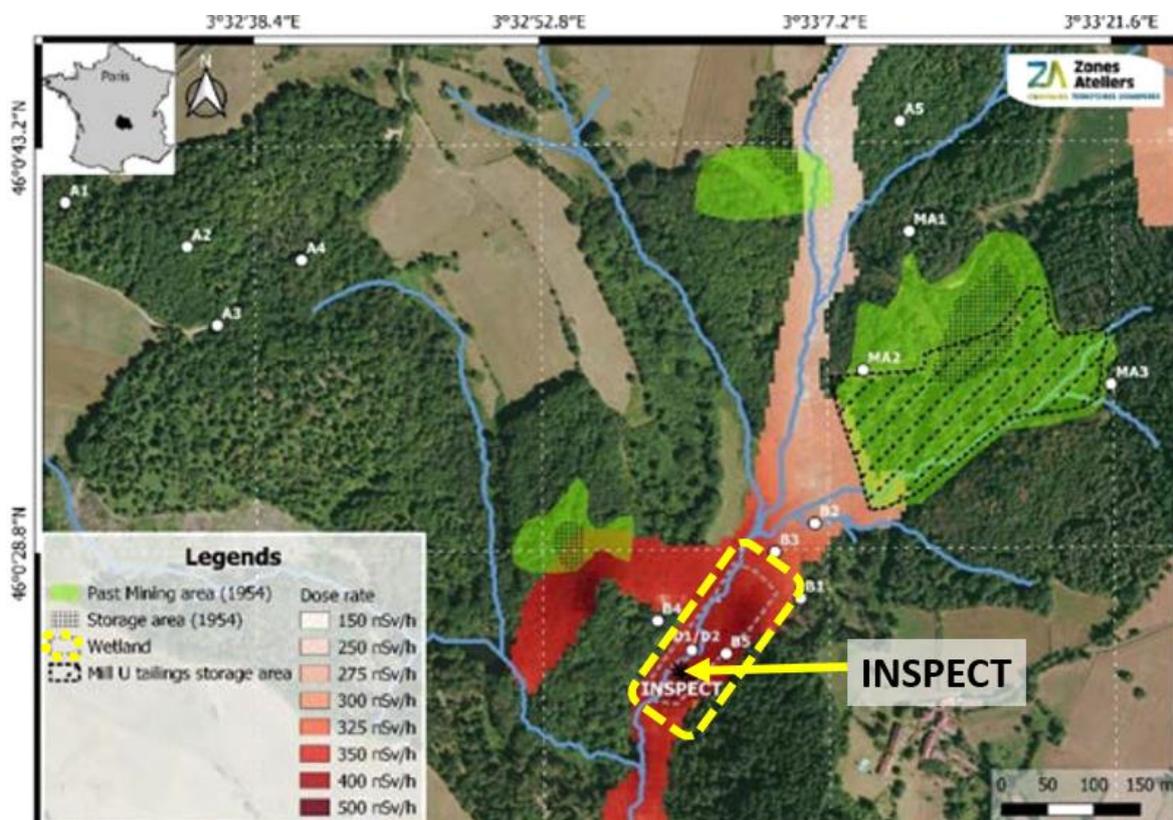


Figure 14 : Carte positionnant dans le bassin versant (du cours d'eau : Le Gourgeat) la zone humide de Rophin (en jaune), l'activité minière passée (en vert) et la zone actuelle de stockage de stériles miniers (en noir), avec des débits de dose gamma interpolés

Ce projet, dans lequel les travaux de cette thèse s'inscrivent, structure plusieurs équipes pluridisciplinaires pour répondre à trois objectifs principaux qui sont : (1) d'identifier l'origine et la spéciation des radionucléides dans le continuum sol-eaux-plantes, et comprendre l'influence des interfaces (nano)-minéral-solution, des matières organiques et des

microorganismes ; (2) d'établir les processus de transferts des radionucléides dans la zone humide : leur transfert passé (origine anthropique ou naturelle des radionucléides), leur labilité (contrôlant la remobilisation des radionucléides vers les sols) et leur biodisponibilité ; (3) d'explorer les interactions radionucléides – biosphère (plantes et microorganismes), afin d'étudier quelle est l'influence de ces radionucléides sur cette biosphère (liée à la spéciation et biodisponibilité des radionucléides), mais également les conséquences directes ou indirectes de la biosphère sur la labilité et biodisponibilité des radionucléides.

b) Echantillonnage de carottes de sol dans la zone humide à l'aval du site de Rophin

Des carottes du profil de sol ont été prélevées dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin et mise en commun pour toutes les équipes participantes pour répondre aux objectifs de ce projet. Une première carotte de sol a été prélevée en septembre 2020 dans la zone humide. Cet échantillon a été prélevé sur les 50 premiers cm de sol de la zone humide à l'aide d'un carottier russe. Ce carottier russe contenant la carotte de sol a été immédiatement placé dans une boîte à gants portable sous atmosphère d'azote (Figure 15).



Figure 15 : Carotte de sol de 50cm prélevée en septembre 2020 dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin à l'aide d'un carottier russe placé directement dans une boîte à gants portable sous atmosphère d'azote (Crédit : Mireille Del Nero, IPHC).

La carotte a ensuite été découpée à l'intérieur de la boîte à gants en fonction des différents horizons principaux observés puis conditionnés pour le transport. Des sous-échantillons ont été prélevés pour nos études microbiologiques dans le but de caractériser les communautés bactériennes par métabarcoding (Voir chapitre 4). Ces sous-échantillons ont été conditionnés pour transport dans de l'azote liquide, et congelés à -80°C au laboratoire. Dans le cadre de notre étude, trois profils de sols différents ont été échantillonnés pour déterminer les populations bactériennes dans chaque profil : une couche de surface riche en matière organique (MO), la zone intermédiaire blanche impactée par les activités minières (ZB), et une couche profonde humifère (MH) (Figure 16).

		Horizon % eau	Couche % eau
Couche MO : Couche de surface de matière organique	H1	H1 (10 cm)	Organique 85%
		H2 (2 cm)	Organique Humique (org-arg.) 86%
Couche ZB : Zone intermédiaire blanche caractérisée par de fortes concentrations en uranium	H2 H3.1	H3.1 2 cm	Argileux blanc 38 %
	H3.2	H3.2(3) 6,5 cm	39% Arg. blanche 40 %
	H3.4	H3.4 2,5 cm	Transition-Arg. gris-blanc 46%
	H4.1.1	H4.1.1 5,5 cm	Argileux gris 62%
	H4.1.2	H4.1.2 3,5 cm	66% Arg. gris-marron 63%
	H4.2	H4.2 3 cm	Transi-Arg. marron 75%
Couche MH : Couche profonde humifère	H5.1	H5.1 8 cm	Argilo- sableux Sablo-arg. orga. 73%
	H5.2	H5.2 5 cm	organique Arg.-sab. Humique 84%

Figure 16 : Log stratigraphique des différentes couches du profil de sol de la carotte prélevée dans la zone humide en septembre 2020 (Crédit : Mireille Del Nero, Olivier Courson, IPHC)

Une deuxième carotte de sol a été prélevée en juin 2021 dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin. Cette carotte a été prélevée dans le but d'isoler des souches bactériennes provenant de celle-ci, en particulier dans la zone intermédiaire caractérisée par de fortes concentrations en uranium. Le prélèvement de cette carotte a été réalisée dans les mêmes conditions que la carotte de septembre 2020 (carottier russe pour extraire les 50 premiers cm et

placement immédiat de ce dernier dans une boîte à gants portable sous atmosphère d'azote). Les différents horizons de la carotte de juin 2021 ont été définis comme pour la carotte de septembre 2020 avec une couche de surface riche en matière organique (MO), la zone blanche intermédiaire impactée par les activités minières (ZB) et une couche profonde humifère (MH). Différents échantillons de sols provenant de ces 3 couches de sol différentes, ont été prélevés pour isoler et identifier les bactéries présentes dans chacune de ces couches de la carotte de sol (Figure 17). Ces échantillons ont été prélevés directement en boîte à gants dans des tubes cryogéniques à l'aide d'une spatule stérile, et préparés pour le transport. Une fois au laboratoire, ces échantillons ont été stockés à 4°C.



Figure 17: Répartition des échantillons prélevés dans la carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin, en juin 2021 (Crédit photo : Olivier Courson, IPHC)

c) Caractérisation physico-chimique des carottes de sol échantillonnées

Pour la carotte de septembre 2020, les éléments traces (arsenic (As), baryum (Ba), béryllium (Be), cadmium (Cd), cobalt (Co), chrome (Cr), césium (Cs), cuivre (Cu), gallium (Ga), germanium (Ge), hafnium (Hf), indium (In), niobium (Nb), nickel (Ni), plomb (Pb), rubidium (Rb), antimoine (Sb), scandium (Sc), tin (Sn), strontium (Sr), tantale (Ta), thorium (Th), uranium (U), vanadium (V), tungstène (W), yttrium (Y), zinc (Zn), zirconium (Zr), lanthane (La), cérium (Ce), praséodyme (Pr), néodyme (Nd), samarium (Sm), europium (Eu), gadolinium (Gd), terbium (Tb), dysprosium (Dy), holmium (Ho), erbium (Er), thulium (Tm), ytterbium (Yb) et lutécium (Lu)) et majeurs (dioxyde de silicium (SiO_2), alumine (Al_2O_3), oxyde de fer (Fe_2O_3), oxyde de magnésium (MgO), oxyde de calcium (CaO), oxyde de sodium (Na_2O), oxyde de potassium (K_2O), dioxyde de titane (TiO_2), et carbone organique (Corg)) ont

été caractérisés dans les différents horizons par ICP-OES et ICP-MS, au laboratoire IPHC à Strasbourg (Tableau 7).

Tableau 7 : Concentrations en éléments traces (en µg/g) et éléments majeurs (%) dans chaque couche de la carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin en septembre 2020

Element trace	Couche MO	Couche ZB	Couche MH
As (µg/g)	95,21	58,07	63,86
Ba (µg/g)	195,64	189,51	163,93
Be (µg/g)	17,56	15,86	14,80
Bi (µg/g)	4,27	8,27	0,90
Cd (µg/g)	3,29	1,12	1,62
Co (µg/g)	3,68	2,97	2,02
Cr (µg/g)	22,80	31,20	19,07
Cs (µg/g)	17,27	28,47	17,41
Cu (µg/g)	138,60	171,96	22,74
Ga (µg/g)	14,50	29,09	17,00
Ge (µg/g)	1,33	1,83	1,24
Hf (µg/g)	1,36	2,39	3,24
In (µg/g)	0,10	0,28	0,06
Nb (µg/g)	7,53	10,81	18,87
Ni (µg/g)	9,40	8,36	7,42
Pb (µg/g)	579,97	1605,74	137,50
Rb (µg/g)	163,91	351,64	222,94
Sb (µg/g)	2,37	4,22	1,55
Sc (µg/g)	4,26	6,78	5,21
Sn (µg/g)	8,16	13,79	12,89
Sr (µg/g)	65,42	46,68	53,98
Ta (µg/g)	1,27	1,89	3,93
Th (µg/g)	12,63	21,25	13,39
U (µg/g)	510,92	1089,23	54,89
V (µg/g)	41,35	66,99	26,83
W (µg/g)	6,70	11,73	7,63
Y (µg/g)	16,93	34,04	23,50
Zn (µg/g)	116,81	196,56	58,73

Element trace (Lanthanides)	Couche MO	Couche ZB	Couche MH
Zr (µg/g)	36,04	60,95	86,81
La (µg/g)	17,09	29,61	16,60
Ce (µg/g)	36,63	63,82	37,74
Pr (µg/g)	4,59	7,89	4,42
Nd (µg/g)	16,97	29,52	15,98
Sm (µg/g)	3,83	6,98	3,60
Eu (µg/g)	0,47	0,85	0,32
Gd (µg/g)	3,08	5,88	3,01
Tb (µg/g)	0,50	0,98	0,57
Dy (µg/g)	2,99	5,91	3,88
Ho (µg/g)	0,59	1,16	0,83
Er (µg/g)	1,60	3,07	2,37
Tm (µg/g)	0,24	0,46	0,40
Yb (µg/g)	1,57	2,91	2,72
Lu (µg/g)	0,23	0,42	0,40

Element majeur	Couche MO	Couche ZB	Couche MH
SiO ₂ (%)	36,20	67,56	44,14
Al ₂ O ₃ (%)	7,79	14,80	10,64
Fe ₂ O ₃ (%)	1,63	1,45	0,80
MgO (%)	0,39	0,66	0,24
CaO (%)	0,92	0,31	0,52
Na ₂ O (%)	0,25	0,37	1,35
K ₂ O (%)	1,76	3,64	2,97
TiO ₂ (%)	0,16	0,20	0,28
Corg (%)	20,79	2,51	15,30

Des analyses minéralogiques ont également été effectuées sur cette carotte de sol de septembre 2020. Ces couches de sol présentent des profils physicochimiques différents. La couche MO est majoritairement composée de quartz, feldspath et kaolinites, ainsi que de teneurs élevées en COT (Carbone Organique Total) avec une composante humique de la matière organique majoritaire (fraction peu soluble et riche en molécules aromatiques). D'autre part, la couche ZB est composée majoritairement de quartz et d'argiles (type smectite), avec une teneur en COT faible et une matière organique à composante fulvique majoritaire (soluble et riche en molécules aliphatiques). De plus, de fortes concentrations en uranium et plomb (1089 et 1606 µg/g respectivement) ont été observées dans cette couche de sol ZB, accompagnées de concentrations supérieures en thorium, lanthanides et césium par rapport aux autres couches. Enfin, la couche MH avait des caractéristiques proches de la couche MO, avec la présence de quartz et feldspath majoritaires, une fraction argileuse à kaolinite-illite et une matière organique

abondante à forte composante humique. Ces observations démontrent que la couche MH est un paléosol, qui a été recouvert par une couche argileuse.

Enfin, une analyse des éléments traces et majeurs des différents horizons de la carotte de sol de juin 2021 a également été réalisée au laboratoire IPHC à Strasbourg par ICP-OES et ICP-MS. En particulier, les concentrations en arsenic (As), chrome (Cr), cuivre (Cu), plomb (Pb), thorium (Th), uranium (U) et zinc (Zn), dont les effets toxiques sur les bactéries ont été révélés (Abbas et al., 2014 ; Choudhury et Srivastava, 2001 ; Coetzee, 2018 ; Doose et al., 2021 ; Gao et al., 2019 ; Kushwaha et al., 2018 ; Ladomersky et Petris, 2015), sont résumées dans le Tableau 8 ci-dessous :

Tableau 8: Concentrations en As, Cr, Cu, Pb, Th, U et Zn (en $\mu\text{g/g}$) dans chaque couche de la carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin en juin 2021

Couche de sol	As $\mu\text{g/g}$	Cr $\mu\text{g/g}$	Cu $\mu\text{g/g}$	Pb $\mu\text{g/g}$	Th $\mu\text{g/g}$	U $\mu\text{g/g}$	Zn $\mu\text{g/g}$
MO	86 ± 4	28 ± 1	60 ± 5	421 ± 42	13 ± 1	351 ± 18	112 ± 11
ZB	207 ± 10	33 ± 2	164 ± 13	3405 ± 341	24 ± 2	1217 ± 61	388 ± 39
MH	141 ± 7	34 ± 2	71 ± 6	2578 ± 258	20 ± 2	466 ± 23	391 ± 39

Brièvement, comme pour la carotte de septembre 2020, de fortes concentrations en uranium et en plomb (1217 et 3405 $\mu\text{g/g}$ respectivement), ont été mesurées dans la zone intermédiaire blanche (ZB). Les concentrations en uranium mesurées dans les trois horizons sont très supérieures à la concentration moyenne d'uranium de la croûte supérieure (environ 2 $\mu\text{g/g}$) (Schöner et al., 2009). Cependant ces concentrations en uranium semblent en adéquation avec les concentrations en uranium mesurées dans des zones humides à proximité d'anciens sites d'extraction d'uranium (jusqu'à plusieurs milliers de $\mu\text{g/g}$) (Li et al., 2014 ; Mangeret et al., 2018 ; Stetten et al., 2018 ; Wang et al., 2014).

II- Analyses des communautés bactériennes par métabarcoding

Une grande majorité des bactéries présentes dans l'environnement ne peuvent être cultivées en laboratoire, limitant l'étude de la diversité bactérienne globale par cette approche. En effet il est généralement difficile de reproduire les conditions environnementales originelles dans la composition d'un milieu de culture. De plus, certains microorganismes peuvent être dans un état viable mais non cultivable. Pour cela, de nouvelles méthodes pour évaluer la diversité des communautés bactériennes, indépendantes de la culture, ont été développées, basées en particulier sur l'information génétique de ces communautés bactériennes. En particulier, le métabarcoding (ou métagénomique ciblée) est une technique de biologie moléculaire qui permet l'identification simultanée de multiples espèces dans un échantillon environnemental à partir de leur ADN.

Cette méthode est largement utilisée dans les études de la biodiversité et de l'écologie pour caractériser la composition des communautés microbiennes dans différents écosystèmes, dont les espèces rares ou présentes en faibles quantités dans un échantillon. Le principe de cette méthode consiste à extraire l'ADN total d'un échantillon environnemental, puis à amplifier et séquencer un gène unique commun à toutes les espèces. Dans le cadre de l'étude des procaryotes, dont en particulier des bactéries, le gène codant pour l'ARNr 16S est le plus utilisé pour les analyses de métabarcoding (Falentin et al., 2019). Ce gène de l'ARNr 16S, codant pour la petite sous unité des ribosomes des procaryotes, est constitué d'une alternance de régions conservées et variables. Les régions conservées permettent de définir des amorces dites « universelles » pour l'amplification de ce gène, alors que les régions variables sont considérées comme des marqueurs reflétant les relations phylogénétiques entre les organismes (Falentin et al., 2019). De plus le gène de l'ARNr 16S est peu soumis aux transferts horizontaux. C'est pourquoi ce gène est utilisé universellement pour la classification taxonomique des bactéries. L'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S est effectuée à l'aide de technologies de séquençage de nouvelle générations (NGS) qui permettent de séquencer simultanément des millions de fragments d'ADN à partir d'un échantillon environnemental. Les séquences obtenues sont ensuite comparées à des bases de données de référence pour identifier les espèces bactériennes présentes dans l'échantillon.

1) Extraction de l'ADN et vérification de l'ADN par électrophorèse

L'extraction de l'ADN est réalisée en suivant le protocole du kit Fast DNA spin kit for Soil (MP Biomedicals). Pour chaque échantillon de sédiments des sources minérales ou de sol de la carotte de Rophin, environ 0,3 g est introduit dans un tube contenant des billes de verre et de tungstène de différentes tailles qui permettent une lyse mécanique des cellules. Un tampon de phosphate de sodium (978 μ l) et un tampon de lyse MT (122 μ l) sont ajoutés afin de dégrader et stabiliser les cellules lors de l'agitation. Ces tubes sont placés sous agitation active générée par le FastPrep-24TM instrument (MP Biomedicals) pendant 40 secondes. Toutes les centrifugations suivantes sont réalisées à 14 000g. Après centrifugation du lysat obtenu pendant 5 minutes, une solution de PPS (Protein Precipitation Solution) est ajoutée au surnageant du lysat. Après agitation du mélange puis centrifugation pendant 5 minutes, le culot obtenu contenant les protéines est éliminé et le surnageant est déposé dans un nouveau tube dans lequel est ajouté une matrice de fixation (Binding Matrix Suspension) contenant de la silice qui a une forte affinité avec l'ADN. La silice, sur laquelle l'ADN s'est fixé, est isolée de la phase liquide par filtration et centrifugation sur une colonne. L'ADN est ensuite précipité par ajout d'une solution d'éthanol (SEWS-M). Enfin l'ADN est élué avec de l'eau stérile permettant d'obtenir 25 μ l d'ADN purifié conservé à -20°C.

Les fragments d'ADN extraits ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (m/v) préparé dans un tampon TBE 1X (Tris Borate EDTA) et contenant du bromure d'éthidium (BET) à 0,003% (v/v). L'ADN extrait est mélangé avec un tampon de charge violet puis déposé dans chaque puit du gel d'agarose placé dans une cuve électrophorétique. Pour chaque gel réalisé, un marqueur de taille, correspondant à l'ADN du phage λ digéré par les enzymes de restriction EcoRI et HindIII (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, ThermoFisher) a été ajouté. La migration de l'ADN sur le gel est réalisée pendant 45 minutes à une tension de 90V dans du tampon TBE 1X. A la suite de la migration, l'ADN séparé sur le gel est visualisé sous U.V. dans un Gel DocTM XR+ (Bio-Rad) contrôlé par le logiciel Image Lab SoftwareTM (Bio-Rad). La révélation de l'ADN est possible grâce à la présence du BET qui s'intercale entre les bases de l'ADN et émet une fluorescence orangée lorsqu'il est exposé à des rayons U.V.

Par la suite, à partir de l'analyse du gel par le logiciel Image Lab SoftwareTM (Bio-Rad), il est possible de déterminer la teneur en ADN extraite pour chaque échantillon (Figure 18, a). Pour cela, les valeurs de teneur en ADN attribuées à chaque bande du marqueur de taille (indiquées par le fournisseur) sont renseignées dans le logiciel, permettant de tracer une courbe

et 0,04 unité/µl de Taq ADN polymérase (Eurobiotaq ADN polymérase, Eurobio). L'ajout de BSA permet d'améliorer le rendement de l'amplification par PCR (Farell et Alexandre, 2012). La réaction d'amplification par PCR comporte une étape initiale de dénaturation de l'ADN génomique, suivie d'une succession d'étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation, durant lesquelles le gène de l'ARNr 16S est multiplié plusieurs fois à partir d'une faible quantité de ce dernier. Pour cela, lors de l'étape d'hybridation, les amorces 515f et 928r se lient spécifiquement au gène de l'ARNr 16S. Puis, lors de l'étape d'élongation, la Taq ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN matrice en présence de dNTPs. Les tubes sont introduits dans un thermocycleur (Bio Rad i-cycler) dont le programme pour l'amplification standard est donné dans le Tableau 9, ci-dessous :

Tableau 9 : Cycles d'amplification appliqués au cours des réactions de PCR

Etape	Cycle	Temps (min)	Température (°C)
Dénaturation initiale	1	5	95°C
Dénaturation	35	1	95°C
Hybridation		1	55°C
Elongation		1	72°C
Terminaison	1	10	72°C
Maintien	-	-	4°C

L'amplification par PCR a été vérifiée par migration par électrophorèse des fragments d'ADN amplifiés sur gel d'agarose à 1%. La quantité d'ADN a été quantifiée à l'aide du fluorimètre Qubit avec le kit Qubit dsDNA HS reagent Assay (Life Technologies). Les produits de PCR ont été envoyés à la plateforme Get-Plage (INRAE, Toulouse, France) pour multiplexage, purification et séquençage sur le séquenceur Illumina MiSeq.

3) Assignation taxonomique et analyse des données

Les données de séquençage bactérien ont été analysées via le pipeline bioinformatique FROGS (Finding Robust Outlier GeneS) sur la plateforme Galaxy (Escudié et al., 2018). FROGS est un pipeline de traitement de données qui permet de traiter et d'analyser les données de séquençage d'ADN environnemental provenant d'échantillons biologiques divers (eau, sol, sédiments) et permet l'analyse de la diversité taxonomique de ces échantillons. Le pipeline FROGS utilise des outils bioinformatiques pour filtrer, assembler et annoter les séquences

d'ADN. En bref, après une étape de prétraitement des données et assemblage des lectures de séquences avec Vsearch (Rognes et al., 2016), les lectures de séquences sont regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) avec Swarm (Mahé et al., 2014) qui fonctionne avec un seuil de clustering de 97%. Enfin, après une étape de suppression des séquences chimériques et une étape de filtration (suppression des singletons et des séquences 16S chloroplastiques et mitochondriaux), les séquences des OTUs ont été comparées aux bases de données SILVA_132_16s (Quast et al., 2013). Cette banque de données est l'une des plus riches en termes de séquences de gènes d'ARNr 16S qui, de plus, est mise à jour fréquemment (Falentin et al., 2019). Cette analyse bioinformatique aboutit à la production d'une table d'abondance des OTUs avec leurs affiliations taxonomiques, appelée plus communément « table d'OTUs ».

Enfin l'analyse des données de séquençage des communautés bactériennes a été réalisée à l'aide du package *phyloseq*, du logiciel R (McMurdie et Holmes, 2013). En effet, ce package a été développé pour permettre la manipulation, l'analyse et la visualisation de données de séquençage de communautés microbiennes. En particulier, ce package a permis de calculer et visualiser graphiquement les indices de diversité alpha et beta des différents échantillons étudiés. Les différents indices de diversité alpha mesurés pour comparer les communautés bactériennes de chaque échantillon sont :

- Le nombre d'OTUs observées par échantillon
- La richesse spécifique avec l'indice de Chao1, qui représente le nombre d'espèces que comptent les communautés bactériennes, sans tenir compte de l'abondance relative de chacune des espèces.
- La diversité bactérienne avec l'indice de Shannon, qui reflète aussi bien le nombre d'espèces que leur abondance dans un échantillon

De plus, le package *phyloseq* a également été utilisé pour l'analyse de la composition taxonomique des communautés bactériennes, en calculant l'abondance relative de chaque phylum par échantillon.

III- Isolement et identification des souches bactériennes

La culture bactérienne permet, selon l'objectif de notre étude, d'isoler et d'identifier des souches bactériennes provenant des deux environnements radioactifs étudiés : les sources minérales et la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin. Bien que les méthodes de cultures ne permettent pas d'obtenir une vue exhaustive de la diversité bactérienne dans ces deux environnements (0,1 à 10% des cellules sont cultivables en laboratoire) (Rappé et Giovannoni, 2003), contrairement à l'analyse de la diversité par métabarcoding, le principal avantage de la culture bactérienne dans le cadre de notre étude est qu'elle permet d'obtenir « physiquement » les souches bactériennes. Par conséquent, des expériences de mise en contact d'isolats bactériens avec l'uranium seront réalisables et permettront de mieux comprendre comment ces souches interagissent avec l'uranium dans ces environnements.

1) Isolement de souches bactériennes

Afin de pouvoir isoler les bactéries présentes dans les échantillons d'eau des sources minérales et de sol de la carotte prélevée dans la zone humide à l'aval du site de Rophin, une mise en culture non sélective sur milieu nutritif TSB (0,1X) (Tryptic Soja Broth) solide a été réalisée afin d'obtenir la plus large gamme de bactéries présentes dans ces deux environnements. Ce milieu, déjà utilisé au sein du laboratoire LP2iB pour l'isolement de souches provenant d'environnements radioactifs, est un milieu d'enrichissement polyvalent utilisé dans des procédures qualitatives pour le test de stérilité et pour l'enrichissement et la culture de microorganismes aérobies courants. La composition de ce milieu de culture est donnée en Annexe 1. Le milieu TSB (0,1X) solide est obtenu en ajoutant 3g/L de TSB avec 15g/L d'agar. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 121°C et coulé dans des boîtes de Pétri stériles.

a) Ensemencement des échantillons d'eau des sources minérales

Pour les échantillons d'eau provenant des sources (Bard, Dourieux, Gravier, 3 Sauts, Montagne, Mariol et Salins), après homogénéisation des échantillons, 300µl de chaque échantillon a été ensemencé en triplicata par étalement sur des boîtes de Pétri en TSB (0,1X), selon la méthode des dilutions successives de 10^{-1} à 10^{-4} . Le pH pour la préparation du milieu de culture est de 6,5 pour les sources de Montagne et Mariol, et Salins, et de 6,7 pour Bard, 3 Sauts, Dourieux et Gravier. Ce pH est choisi afin de se rapprocher des valeurs

environnementales mesurées pour chaque source. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 25°C pour une durée de 10 jours, pour favoriser la croissance des bactéries mésophiles. La Figure 19 ci-dessous présente une dilution en série obtenue pour la croissance bactérienne de l'eau de la source de Graviers échantillonnée en octobre 2019 (duplicata 1).

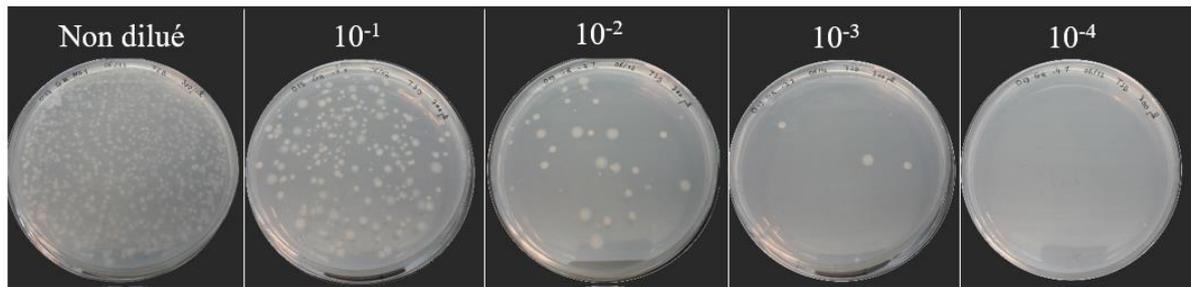


Figure 19: Culture bactérienne par dilution en série de l'échantillon d'eau de la source de Graviers, duplicata 1, après 10 jours d'incubation à 25°C (recto/verso des boîtes de Pétri)

b) Ensemencement des échantillons de sol de la carotte de Rophin

D'autre part, pour les échantillons de sol prélevés à partir de la carotte de Rophin, les bactéries du sol ont été tout d'abord remises en suspension dans une solution d'eau EPPI (Eau Pour Préparation Injectable). Pour cela, 1g de sol de chaque couche a été prélevé et mis dans de l'eau EPPI, puis agité pendant 20min et légèrement centrifugé. Pour chaque échantillon, le surnageant a été prélevé (300µl) et ensemencé en triplicata par étalement sur des boîtes de Pétri en TSB (0,1X) à pH 7, selon la méthode des dilutions successives de 10⁻¹ à 10⁻⁵. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 25°C pour une durée de 10 jours. La Figure 18 ci-dessous présente une dilution en série obtenue pour la croissance bactérienne d'un échantillon de la couche MH dans le milieu TSB (duplicata 1).

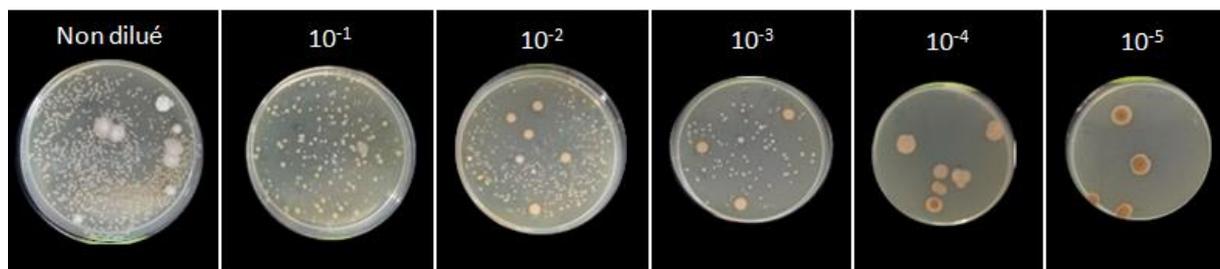


Figure 20: Culture bactérienne par dilution en série de l'échantillon de la couche MH dans le milieu TSB (réplica 1) après 5 jours de croissance à 25°C

c) Isolement des souches bactériennes et conservation

Pour chaque dilution, les colonies différentes sont décrites puis isolées dans une nouvelle boîte de Pétri par la technique des stries qui permet de diluer les cellules en les étalant sur la surface de la boîte de Pétri. Cette technique permet de s'assurer que la colonie transférée dans une nouvelle boîte était composée d'une même cellule bactérienne. Chaque souche nouvellement isolée et repiquée au minimum trois fois jusqu'à s'assurer de la pureté de la souche isolée. Une fois les souches pures isolées sur boîte de Pétri, les cellules de chaque souche sont récupérées à l'aide d'un râteau est introduit soit dans un tube Eppendorf® pour l'extraction d'ADN, ou dans des tubes cryogéniques pour la conservation. En effet, une partie des cellules sont conservées par congélation (à -20°C et -80°C), en présence d'un additif cryoprotecteur, le glycérol (15%), qui pénètre dans les cellules pour abaisser la température et éviter la formation de cristaux de glaces qui peuvent endommager les cellules. Enfin l'autre partie des cellules sont conservées à 4°C dans de l'eau EPPI pour l'extraction d'ADN.

2) Identification des souches bactériennes isolées

L'identification des souches bactériennes isolées a été réalisée par analyse phylogénétique de ces souches obtenues par comparaison de la séquence du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) avec les séquences de souches connues dans des banques de données (GenBank®, NCBI). Pour cela, plusieurs étapes sont nécessaires pour l'obtention des séquences du gène de l'ARNr 16S des souches isolées :

a) Extraction de l'ADN génomique

Les cellules bactériennes des souches isolées qui ont été récupérées dans un Eppendorf® sont centrifugées à 2500g. Après avoir ôté le surnageant, le culot bactérien obtenu est introduit dans le tube de lysing matrix E. L'extraction de l'ADN des souches isolées est réalisée en suivant le protocole du kit Fast DNA spin kit for Soil (MP Biomedicals), comme décrit dans la partie précédente. A la suite des différentes étapes d'extraction, l'ADN génomique extrait est suspendu dans 25µl d'eau EPPI et conservé à -20°C.

b) Amplification par PCR du gène de l'ARNr16S des souches isolées

Pour l'analyse phylogénique utilisée, les amorces 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 907r (5'-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3') sélectionnées et utilisées lors des réactions d'amplification par PCR sont des amorces universelles spécifiques du gène de l'ARNr 16S bactérien (Sack et al., 2010 ; Weisburg et al., 1991). La PCR a été réalisée en microtubes de 200 µl dans lesquels est ajouté un mélange réactionnel (volume final 25µl) composé de : 30ng d'ADN, 10% de tampon 10X (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3 ; KCl 500mM, gélatine 0,01% ; Eurobio) ; 1,5mM de MgCl₂, 200µM de dNTP (Sigma-Aldrich) ; 0,4µM de chacune des deux amorces et 0,04 unité/µl de Taq ADN polymérase (Eurobiotaq ADN polymérase – Eurobio). Un contrôle négatif (eau stérile) a été réalisé pour s'assurer de la stérilité des différents réactifs utilisés, ainsi qu'un contrôle positif pour s'assurer du bon fonctionnement de la PCR. Le programme utilisé pour l'amplification par PCR est le même que celui présenté dans le Tableau 9. Après amplification, la quantité d'ADN amplifiée est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

c) Séquençage et identification des souches bactériennes isolées

Les portions amplifiées sont séquencées par la méthode de Sanger, réalisée par la société Genewiz (Allemagne). Cette méthode a été préférée pour séquencer les souches isolées du fait qu'elle soit précise et fiable, bien qu'elle soit lente et coûteuse contrairement au séquençage nouvelle génération. Les résultats sont obtenus sous forme de fichier texte contenant la séquence et d'un chromatogramme correspondant. Le chromatogramme représente la migration des produits de séquençage marqués par électrophorèse capillaire. Les premières et dernières bases étant généralement peu résolues (apparition de N dans la séquence), ces bases ont été supprimées des séquences brutes fournies par Genewiz.

Les séquences ainsi obtenues des souches bactériennes isolées sont comparées aux banques de données (GenBank®, NCBI) grâce au logiciel BLASTn (Altschul et al., 1997). Leur similarité de séquence par rapport aux organismes de référence répertoriés dans les bases de données permet d'identifier l'espèce la plus proche de la souche isolée. Les séquences sont ainsi classées par unité taxonomique opérationnelle (OTU), une OTU étant un regroupement d'individus d'une même espèce dont les séquences d'ADNr 16S présentent une similitude de plus de 97%.

d) Analyses phylogénétiques

En plus de permettre l'identification des bactéries cultivables, les résultats du séquençage permettent d'établir un arbre phylogénétique. Les arbres sont obtenus par le logiciel MEGA-X (Kumar et al., 2018). Les séquences d'ADNr 16S des souches isolées et des organismes apparentés sont alignées par la méthode ClustalW (Thompson et al., 1994). Les arbres phylogénétiques sont créés à partir de la méthode statistique de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987), indiquant la position des souches isolées par rapport aux microorganismes connus. La robustesse statistique des embranchements des arbres phylogénétiques obtenue est donnée par la méthode de bootstrap réalisée sur 1000 répliques (Felsenstein, 1985). De ce fait, cet arbre permet de situer génétiquement les souches isolées dans notre étude par rapport aux espèces connues.

IV- Exposition des bactéries à l'uranium

Un des objectifs de cette thèse était d'explorer les mécanismes d'interaction mis en place par des souches bactériennes isolées des sources minérales et du site de Rophin avec l'uranium. Pour cette raison, plusieurs souches bactériennes ont été mise en contact avec l'uranium pour étudier leur résistance, interaction et capacité à éliminer l'uranium en solution. Pour l'ensemble de ces expériences, une solution mère d'uranium à 100mM a été préparée en dissolvant une quantité appropriée de sel de nitrate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) dans 0,1M d'acide chlorhydrique (HCl) puis stérilisée par filtration à travers un filtre à seringue de 0,22 μm (Millipore, USA). Les diverses expériences d'exposition bactérie-uranium réalisées, dont les résultats sont présentés dans le chapitre 5, sont décrites ci-dessous :

1) Cultures pour l'étude de la résistance de souches bactériennes à l'uranium

Plusieurs souches bactériennes ont été sélectionnées pour étudier leur résistance à l'uranium dans le milieu de culture « Freshwater Minimal Medium » (FMM) avec deux sources de phosphate différentes : le β -glycérophosphate (FMM 1) et le sodium trimétaphosphate (FMM 2). Ce milieu minimal a été proposé par Newsome et al., 2015 pour étudier la biominéralisation et la bioréduction de l'uranium par une souche bactérienne (*Serratia*). La composition de ce milieu est donnée en Annexe 1. Au préalable, les souches bactériennes ont été cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) à 20g/l (composition donnée en Annexe 1) pendant 48 heures à 30°C, puis culottées pendant 5 minutes par centrifugation à 5600 rpm et lavées 2

fois avec une solution physiologique de NaCl (0,9%). Les cellules ont été diluées et inoculées pour une densité optique finale de 0,02 (595nm) dans une plaque 96 puits à fond plat (Thermo Scientific™) qui contenant du milieu FMM 1 et FMM 2 avec ou sans une concentration de 100µM d'uranium. Chaque condition a été réalisée en triplicata. La croissance bactérienne en milieu liquide a été suivie par mesure de la densité optique (595nm) toutes les heures à l'aide du spectrophotomètre UV-Visible (Multiskan FC, ThermoFisher) pendant 70 heures à 30°C. Cette méthode est basée sur la mesure de l'effet de trouble généré par une suspension bactérienne, et proportionnel à la biomasse présente dans la suspension.

La Figure 21 ci-dessous montre une courbe de croissance bactérienne typique de bactéries en milieu non renouvelé (appelé également culture en batch), suivant une cinétique générale caractéristique comportant quatre phases distinctes : 1) la phase de latence, 2) la phase exponentielle de croissance, 3) la phase stationnaire et 4) la phase de déclin.

La phase de latence correspond au temps d'adaptation nécessaires aux bactéries pour synthétiser les enzymes leur permettant d'assimiler les éléments du milieu pour leur croissance. La phase exponentielle de croissance correspond à la phase où les bactéries vont assimiler le plus activement les substrats contenus dans le milieu. Lors de cette phase, les cellules bactériennes se divisent rapidement avec un taux de croissance maximal et constant. Par la suite, la croissance bactérienne va atteindre une phase stationnaire où autant de cellules apparaissent qu'il n'en disparaît par lyse cellulaire. Enfin lorsque le nombre de divisions cellulaires devient inférieur au nombre de cellules qui meurent, une phase de déclin est observée due à un épuisement des éléments nutritifs du milieu ainsi qu'une augmentation de catabolites toxiques produits par les bactéries lors de leur croissance. Les paramètres de croissance (taux de croissance maximale, temps de génération, population bactérienne) sont déterminés à partir des courbes de croissance obtenues pour chaque bactérie.

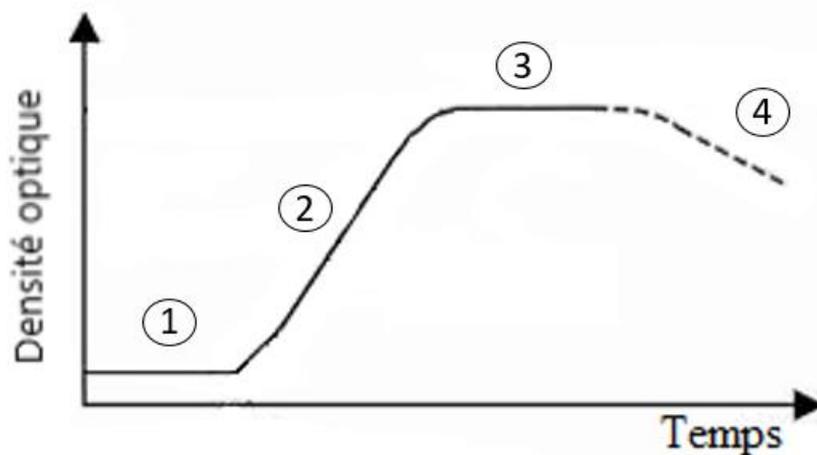


Figure 21: Schéma d'une courbe de croissance bactérienne en milieu non renouvelé. 1) Phase de latence 2) Phase exponentielle 3) Phase stationnaire 4) Phase de déclin

Les courbes de croissance ont été analysées à l'aide du package *Growthcurver* du logiciel R (Sprouffske et Wagner, 2016), permettant de résumer les paramètres de croissance à partir des expériences de courbe de croissance bactérienne réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaques. En particulier, ce package permet de calculer le taux de croissance intrinsèque (nommé r) de la population de chaque souche étudiée qui correspond au taux de croissance si aucune restriction de la taille de la population n'est imposée. L'impact de l'uranium sur la croissance a été observé en comparant les taux de croissance (r) en présence ou absence d'uranium pour chaque souche étudiée, dans les deux milieux de cultures testées (FMM 1 et FMM 2).

2) Etude des mécanismes d'interaction entre les bactéries et l'uranium

a) Exposition des bactéries à l'uranium dans une solution de NaCl (0,9%)

Pour cette expérience, 6 souches bactériennes (O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp*), O19 DO -1 2 16 (*Pseudomonas*), S20 SAB -1 1 3 (*Aeromonas salmonicida*), A17 12 -22 (*Serratia fonticola*), A17 51 -24 (*Pseudomonas sp.*) et A17 N3 ND1 16 (*Pseudomonas jessenii*)) ont été préalablement cultivées dans du milieu LB jusqu'à la phase stationnaire. La croissance de ces souches a été arrêtée par centrifugation (5600rpm pendant 5 minutes) puis le culot bactérien a été lavé deux fois dans une solution de NaCl (0,9%) et inoculé pour une densité optique finale de 0,4 (595nm) dans une solution de NaCl (0,9%) en présence de 100 μ M d'uranium

($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à pH 4 dans des tubes Eppendorf®. Des tubes avec des cellules bactériennes tuées par autoclavage (121°C pendant 20 minutes), et sans bactéries ont été testés comme témoins. Pour le contrôle des cellules tuées, la biomasse des 6 souches bactériennes récupérée après culture dans le milieu LB a été autoclavée à 121°C pendant 20 minutes. Toutes les conditions ont été réalisées en triplicata. L'incubation de tous les échantillons a été réalisée à 30°C dans des conditions statiques pendant 24 heures. Les concentrations en uranium et PO_4^{3-} ont été mesurées à différents intervalles (1h, 3h, 5h, 7h, 9h et 24h) pour chaque condition réalisée. Avant chaque mesure, les tubes Eppendorf® ont été centrifugés pendant 3 minutes à 8000rpm. L'U(VI) dans le surnageant a été déterminé par méthode spectrophotométrique en utilisant le Bromo-Padap (méthode décrite ci-dessous). En parallèle, la concentration en PO_4^{3-} a également été mesurée par dosage spectrophotométrique utilisant le molybdate d'ammonium (méthode décrite ci-dessous). La capacité de ces 6 souches bactériennes à immobiliser l'uranium a été étudiée en calculant le pourcentage d'élimination de l'U(VI) dissous par rapport au témoin sans bactéries.

b) Exposition des bactéries à l'uranium dans une solution de MOPS + β -glycérophosphate

La capacité des cellules de O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) et A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) à biominéraliser l'uranium a été étudiée en suivant l'élimination d'U(VI) dissous, ainsi que la concentration en orthophosphates dans le milieu. A cette fin, les cellules des deux souches étudiées ont été cultivées dans du milieu LB (20g/l) à 30°C pendant 48h. Ensuite, les cellules ayant atteint la phase stationnaire ont été lavées deux fois avec une solution de NaCl à 0,9% et inoculée dans un tampon MOPS (acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique) à 20mM (pH 7) complété par 1mM d'uranium ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) pour une densité optique finale de 0,4 (595nm). Le β -glycérophosphate à une concentration de 5mM a été utilisé comme seule source de phosphate organique. Des contrôles abiotiques sans cellules ont été inclus pour exclure toute précipitation spontanée. De plus, des contrôles biotiques, avec des cellules tuées en présence d'uranium (autoclave à 121°C pendant 20min), et avec des cellules bactériennes sans uranium ont été inclus pour vérifier l'activité des enzymes phosphatases. Toutes les conditions ont été réalisées en triplicata. L'incubation des échantillons a été réalisée à 30°C dans des conditions statiques pendant 3 jours. Les concentrations en uranium et PO_4^{3-} ont été mesurées à différents intervalles (0j, 1j,

2j et 3j) pour chaque condition réalisée. Avant chaque mesure, les tubes Eppendorf® ont été centrifugés pendant 3 minutes à 8000rpm. Comme décrit précédemment, les concentrations en uranium et PO_4^{3-} dans le surnageant ont été déterminées par mesure spectrophotométrique. La capacité de ces 2 souches bactériennes à immobiliser l'uranium a été étudiée en calculant le pourcentage d'élimination de l'U(VI) dissous par rapport au témoin sans bactéries.

3) Etude de la capacité d'élimination de l'uranium dans une eau de rivière par un isolat indigène

Cette expérience avait pour objectif d'observer si la souche A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) était capable d'éliminer l'uranium dans une eau de rivière naturelle chargée artificiellement en uranium, avec l'ajout d'une source de phosphate organique (β -glycérophosphate). La souche A17 12 -22 a été cultivée dans du milieu LB jusqu'à la phase stationnaire, culotée par centrifugation (5600rpm pendant 3 minutes) et lavée deux fois dans une solution de NaCl à 9%. Les cellules ont été inoculées dans de l'eau du ruisseau (Le Gourgeat) situé à l'aval de l'ancien site minier de Rophin (préalablement filtrée à $0,22\mu\text{m}$) pour une densité optique finale de 0,5 (595nm), où du MOPS à 20mM (pH 6,8) et de l'uranium ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à 1mM ont été ajoutés. Un contrôle abiotique (sans cellules) a été également réalisé. Toutes les conditions ont été faites en triplicata. Les solutions expérimentales ont été incubées à 30°C dans des conditions statiques pendant 4 jours. Les concentrations en uranium et en PO_4^{3-} dans le surnageant ont été suivies pendant 4 jours (t_0j , t_1j , t_2j , t_3j et t_4j) par mesure spectrophotométrique, après centrifugation des tubes à 8000 rpm pendant 3 minutes avant chaque mesure. La capacité de cette souche bactérienne à immobiliser l'uranium a été étudiée en calculant le pourcentage d'élimination de l'U(VI) dissous par rapport au témoin sans bactéries.

V- Analyses chimiques par spectrophotométrie

1) Principe

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui mesure l'absorbance (A) ou la densité optique (DO) d'une substance chimique donnée en solution. Le principe de cette méthode analytique repose sur l'étude quantitative des interactions entre la lumière et la matière (soluté coloré ou chromophore qui absorbe la lumière visible). Lorsqu'une onde lumineuse monochromatique d'intensité initiale (I_0), de longueur d'onde λ , passe à travers un échantillon

aqueux, une partie passera à travers l'échantillon (I), et le rapport I/I₀, connu comme la transmittance (T), caractérise cette transmission de la lumière. L'autre partie de la lumière sera absorbée par l'échantillon, et cette absorbance (A) de la solution est définie comme :

$$A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) \text{ ou } A = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right)$$

L'absorbance d'une solution dépend de la concentration de l'espèce absorbante (c en mol/L), de la longueur du trajet de la lumière (l en cm) à travers l'échantillon (c'est-à-dire la largeur de la cuvette dans laquelle se trouve l'échantillon) et d'une mesure de la force avec laquelle l'espèce chimique absorbe la lumière (le coefficient d'absorption molaire (extinction), ϵ en L.mol⁻¹.cm⁻¹). La relation entre la lumière absorbée, l'épaisseur de l'échantillon et la concentration de l'échantillon est généralement linéaire et repose sur la loi de Beer-Lambert suivante :

$$A = \epsilon l c$$

Cette relation linéaire se dégrade avec l'augmentation de la concentration et les limites de performance de l'instrument (principalement la lumière parasite non désirée, provenant des réseaux de diffraction du monochromateur). Lorsque les échantillons dépassent la limite supérieure d'absorbance du spectrophotomètre (généralement $A > 1$), les échantillons doivent être dilués. La linéarité peut aussi être affectée occasionnellement par la fluorescence, le pH (qui peut déplacer la longueur d'onde d'absorption de certains chromophores) et la turbidité de l'échantillon (Upstone, 2000).

La densité optique (DO) ou absorbance des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique étudiée. Le schéma de principe d'un spectrophotomètre est illustré sur la Figure 22. Dans le cadre de cette thèse, les analyses de spectrophotométrie UV-Vis ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Hélios Omega (Thermo Fischer Scientific) ou d'un spectrophotomètre Multiskan FC (Thermo Fischer Scientific).

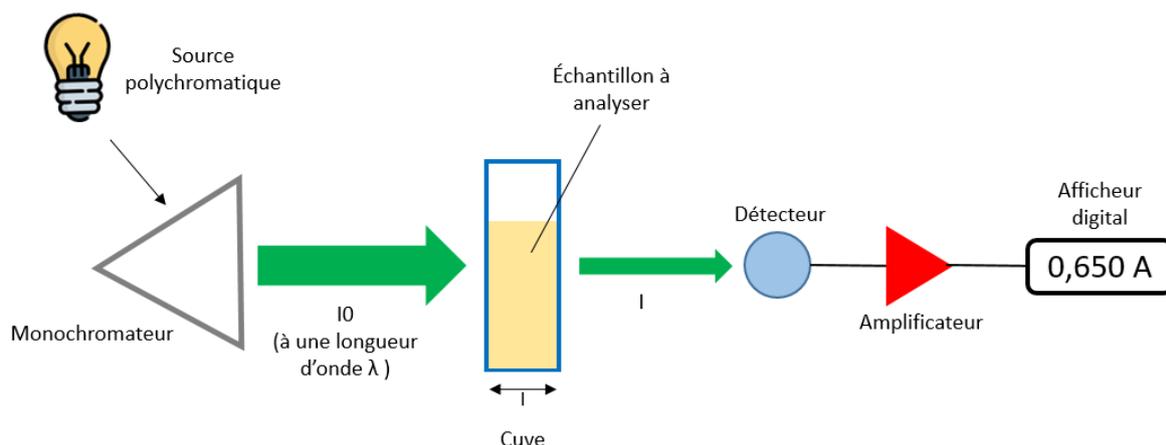


Figure 22 : Schéma de principe d'un spectrophotomètre UV-visible mono faisceau (d'après Piard, 2021)

La cuve contient soit l'échantillon, soit la référence. Les cuves sont souvent en verre (transmettent la lumière > 320 nm) ou en quartz (transmettent la lumière bien en dessous de 190 nm, qui est la limite de longueur d'onde habituelle à bas niveau pour la plupart des spectrophotomètres). Alternativement, de nombreux fabricants produisent des cuves uniques jetables, ou des plaques 96 puits, qui sont généralement utilisées dans les laboratoires et ont été utilisées pour toutes les expériences de cette thèse. L'absorbance mesurée pour chaque échantillon a été comparée à des courbes d'étalonnage réalisées avec des concentrations connues de l'espèce chimique étudiée, dans la même matrice que l'échantillon. Généralement, pour toutes les expériences réalisées, les régressions d'étalonnage avaient un $R^2 > 0,99$. La longueur du trajet est définie comme la largeur de la cuve, qui est généralement de 1 cm (et a été constante tout au long de ce projet). La spectrophotométrie UV-vis a été utilisée pour les tests colorimétriques, ainsi que pour des mesures de biomasse, décrits ci-dessous.

2) Mesure de l'uranium

La concentration en uranium dans le milieu de culture a été déterminée par une méthode spectrophotométrique utilisant le Bromo-PADAP (2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diéthylaminophenol) comme réactif chromogène. Le Bromo-PADAP a été dérivé du PADAP comme méthode sensible et spécifique pour la détermination de l'U(VI) (Johnson & Florence 1971). La Figure 23 présente sa formule semi-développée.

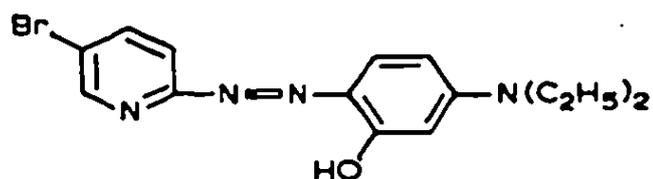


Figure 23 : Formule semi-développée du Bromo-PADAP (2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol), (Johnson & Florence 1971)

Le protocole proposé par Johnson & Florence en 1971 a été modifié et adapté pour être appliqué en plaque 96 puits, permettant une analyse rapide de plusieurs échantillons à la fois. Lorsqu'un échantillon contenant de l'U(VI) est mélangé avec une solution de Bromo-PADAP (0,5 g/l préparé dans de l'éthanol), le complexe uranyl-bromo-PADAP qui se forme dans la phase organique a un coefficient d'extinction molaire (ϵ) de 74 000 à 578 nm. En présence d'une solution complexante (contenant de l'acide 1,2 cyclohexylènedinitrilo) tétraacétique (CyDTA) (26,3 g/l), de l'acide sulfosalicyclique (65 g/l) et 0,5 g de fluorure de sodium (5 g/l)), seuls Cr(III), V(V) et PO_4^{3-} interfèrent de manière significative. Ces éléments sont cependant soit absents ou à des concentrations inférieures aux quantités maximales admissibles (la quantité maximale admissible pour PO_4^{3-} est de 0,5 mg, ce qui inférieure aux concentrations en PO_4^{3-} mesurées dans le cadre de nos expériences). La solution est tamponnée à 7,85 (pour une absorption optimale) à l'aide d'une solution de triéthanolamine (149 g/L), ajustée à pH 7,85 à l'aide de HClO_4 9,2 M (Johnson & Florence 1971 ; Wielinga et al. 2000).

Les composants suivants ont été ajoutés séquentiellement dans chaque puit :

- 25 μl d'échantillon (préalablement centrifugé)
- 65 μl d'eau déminéralisée
- 20 μl de solution complexante (CyDTA + acide sulfosalicyclique + fluorure de sodium à pH 7,85)
- 20 μl de solution tampon (solution de triéthanolamine neutralisée à pH 7,85)
- 100 μl d'éthanol absolu
- 20 μl de solution indicatrice (Bromo-PADAP)

Après mélange des solutions, la plaque est recouverte d'un film adhésif pour plaque 96 puits (favorise les échanges gazeux en limitant l'évaporation), puis laissée pendant au minimum 1 heure pour permettre à la couleur de se développer. L'absorbance est par la suite mesurée à

570nm. Une courbe d'étalonnage a été tracée pour chaque plaque, en utilisant des standards de 10, 20, 40, 60, 80, 100 et 120 μ M d'uranium (VI) (préparées à partir d'une solution mère de nitrate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) à 100 mM dans 0,1% d'HCl) et un blanc constitué d'eau déminéralisée. La gamme de concentrations optimales pour la mesure de l'uranium pour cette méthode spectrophotométrique est de 10 à 100 μ M. Les échantillons dépassant cette gamme de concentration sont au préalable dilués avant l'ajout des réactifs de spectrophotométrie. La Figure 24, ci-dessous, résume le protocole utilisé pour la préparation des échantillons pour le dosage de l'uranium par spectrophotométrie.

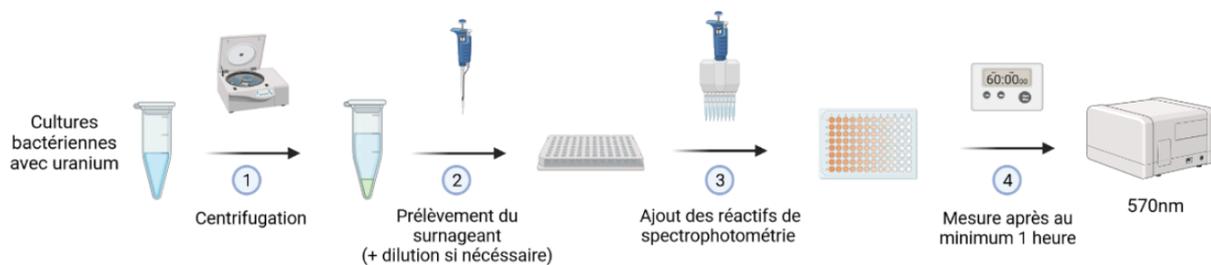


Figure 24 : Schéma du protocole pour la préparation des échantillons pour la mesure de l'uranium par spectrophotométrie

3) Dosage des orthophosphates (PO_4^{3-})

La concentration en ions orthophosphates (PO_4^{3-}), provenant de l'hydrolyse d'une source de phosphate organique (β -glycérophosphate) par l'activité phosphatase des souches bactériennes étudiées, a été mesurée par une méthode spectrophotométrique utilisant le bleu de molybdène. Cette méthode, proposée par He et Honeycutt en 2005, permet de déterminer la concentration en orthophosphate inorganique, adaptée à l'étude de l'hydrolyse enzymatique de phosphates organiques. Cette méthode est basée sur le processus proposé par Murphy et Riley en 1962 qui implique la réaction d'une solution acide de molybdate d'ammonium avec les ions d'orthophosphate inorganique pour former des complexes d'acides phosphomolybdiques. Ce complexe est ensuite réduit, par ajout d'acide ascorbique et d'antimoine, en bleu de molybdène. Cependant il a été démontré que les conditions de dosage de la méthode de Murphy et Riley,

1962, peuvent entraîner une hydrolyse partielle de certains composés de phosphate organique (tel que le β -glycérophosphate), entraînant une surestimation de la concentration en phosphate inorganique (Dick et Tabatabai 1977). Dick et Tabatabai, 1977, ont proposé une méthode adaptée de Murphy et Riley, 1962, pour réduire ces erreurs liées à l'hydrolyse non enzymatique de phosphates organiques. Elle implique la formation rapide d'une couleur bleue de molybdène par la réaction de l'orthophosphate avec les ions molybdate en présence d'acide ascorbique et d'acide trichloracétique. De plus, l'ajout d'un réactif de citrate-arsénite permet la complexation des ions molybdates en excès pour empêcher la formation ultérieure d'une couleur bleue à partir du phosphate dérivé de l'hydrolyse des composés de phosphates organiques acides.

Les différents réactifs utilisés pour le dosage des ions orthophosphates en solution ont été préparés comme suit :

- Réactif A : Acide ascorbique (0,1 M) et acide trichloracétique (0,5M).
- Réactif B : Molybdate d'ammonium (0,01M).
- Réactif C : Citrate de sodium (0,1M), arsénite de sodium (0,2M) et acide acétique glacial (5%).

La procédure rapportée par He et Honeycutt, 2005, a été suivie pour le dosage des orthophosphates. Plus précisément, 200 μ l d'échantillon ont été prélevés dans le surnageant de la solution (après centrifugation des échantillons) où ont été ajoutés successivement 200 μ l de réactif A, 40 μ l de réactif B et 100 μ l de réactif C. Les solutions ont été soigneusement agitées dans chaque cuvette. Les cuvettes sont laissées pendant au minimum 15 minutes pour permettre à la couleur de se développer. L'intensité de la coloration, qui est proportionnelle à la concentration en phosphates, est mesurée par spectrophotométrie à 850nm. Une courbe d'étalonnage a été tracée pour chaque mesure, en utilisant des standards de 10, 20, 40, 50, 60, 80 et 100 μ M de phosphates (préparées à partir d'une solution mère de Na_2HPO_4 à 1mM dans de l'eau déminéralisée) et un blanc constitué d'eau déminéralisée. La gamme de concentrations optimales pour la mesure du phosphate pour cette méthode spectrophotométrique est de 10 à 80 μ M. Les échantillons dépassant cette gamme de concentration sont au préalable dilués avant l'ajout des réactifs de spectrophotométrie. La Figure 25, ci-dessous, résume le protocole utilisé pour la préparation des échantillons pour le dosage du phosphate par spectrophotométrie.



Figure 25 : Schéma du protocole pour la préparation des échantillons pour la mesure des ions orthophosphate inorganique par spectrophotométrie

VI- Observation des cellules bactériennes exposées à l'uranium par microscopie électronique en transmission

L'observation des cellules bactériennes exposées à l'uranium et l'analyse semi-quantitative de la composition élémentaire au niveau cellulaire a été réalisée par des analyses en microscopie électronique en transmission (MET) couplées à la spectrométrie d'émission de rayons X analysée en dispersion d'énergie (X-EDS). Les coupes et les observations des échantillons ont été réalisées au sein de la plateforme d'imagerie en Biologie de l'Université de Bordeaux, le Bordeaux Imaging Center (Univ. Bordeaux, CNRS, INSERM, BIC, UAR 3420) avec le concours de Mme Sabrina Lacomme.

1) Principe de la méthode

La microscopie électronique en transmission (MET ou TEM) est une technique de microscopie basée sur le principe de diffraction des électrons et qui permet d'observer des échantillons à très haute résolution (de l'ordre de la centaine de picomètres) (Kociak, 2007). Son principe de fonctionnement est basé sur l'utilisation d'un faisceau d'électrons pour illuminer l'échantillon. Le faisceau d'électrons est produit par un canon à électrons situé à l'extrémité supérieure de la colonne du microscope. Ce faisceau passe à travers la colonne du microscope par une série de lentilles électromagnétiques condenseurs, dont le rôle est de régler la taille et l'indice du faisceau, jusqu'à atteindre l'échantillon. Le faisceau d'électrons traverse ensuite l'échantillon placé sur une grille spécifique qui permet aux électrons de traverser l'échantillon. Lorsque les électrons traversent l'objet d'étude certains d'entre eux interagissent

avec les atomes de l'échantillon de manière différente, ce qui permet de les utiliser pour diverses analyses (par exemple : propriété structurale, électronique, chimique et optique de l'échantillon) (Figure 26).

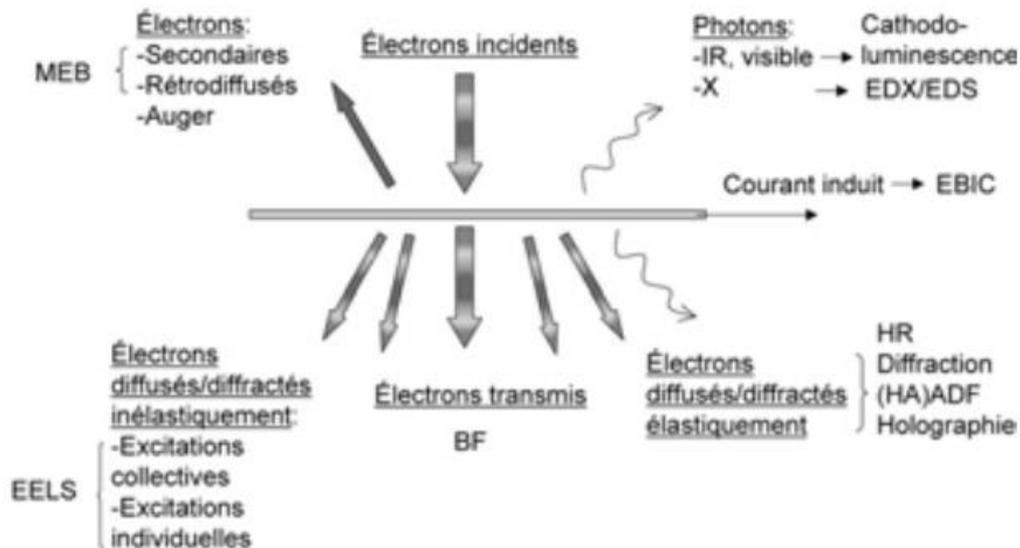


Figure 26 : Schéma des différents processus d'interaction électron-matière et leur lien avec les différentes techniques MET (Kociak, 2007)

Les électrons qui ne sont pas déviés ou absorbés traversent l'échantillon et passent par une série de lentilles, dont la lentille « objectif » où une première image est produite, jusqu'à atteindre le détecteur (par exemple un écran fluorescent, une plaque photo, un scintillateur couplé à une caméra CCD) permettant d'obtenir une image de haute résolution de l'échantillon. Cette haute résolution est atteinte du fait de la très faible longueur d'onde des électrons (loi de De Broglie). Le schéma du principe de fonctionnement d'un MET est illustré sur la Figure 27 ci-dessous :

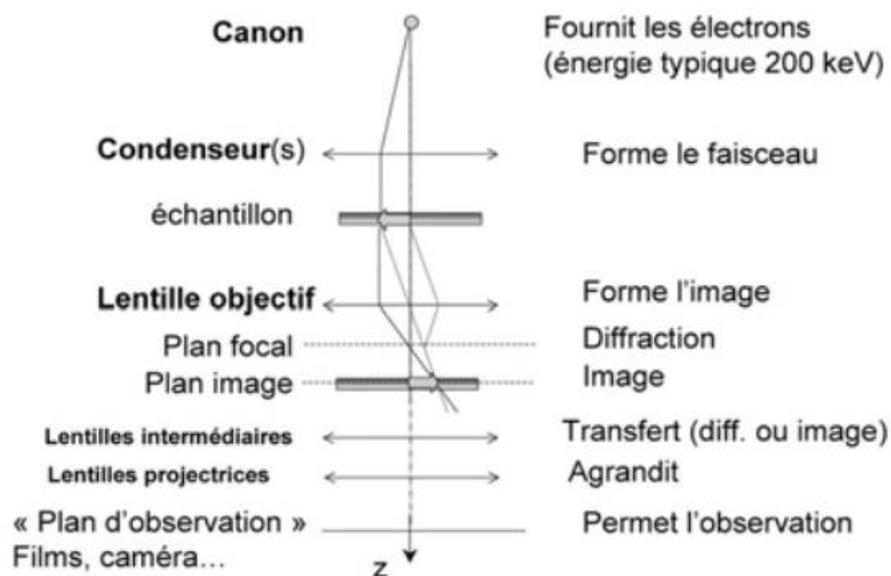


Figure 27 : Schéma du principe de fonctionnement d'un MET (Kociak, 2007)

Il existe un deuxième mode de microscopie électronique en transmission : la microscopie en transmission par balayage (STEM). Pour la STEM, le faisceau d'électrons est focalisé en un point particulier de l'échantillon et non sur toute la surface comme en TEM. Un balayage de la zone d'intérêt point par point permet de collecter les électrons transmis à chaque position et visualiser la région d'intérêt avec une meilleure résolution. De plus, l'utilisation d'un détecteur à champ sombre annulaire à angle élevé (HAADF) en mode STEM permet d'observer un contraste plus important entre les éléments ayant un numéro atomique élevé (dans notre cas l'uranium), et les éléments avec un numéro atomique faible (carbone constituant majoritairement les bactéries). En effet, cette technique est très sensible aux variations de numéro atomique des atomes composant l'échantillon.

La nature de l'interaction électron-matière permet également de coupler les études structurales ou morphologiques à des études de composition chimique (Figure 26). Pour cela, un détecteur EDS (spectrométrie d'émissions de rayons X) est utilisé pour détecter les rayons X émis par l'échantillon lors de l'interaction électron-matière. En effet, lorsque les électrons traversent l'échantillon, les interactions électron-matière entraînent l'émission de rayons X à des énergies spécifiques, caractéristiques des éléments chimiques présents. Ces rayons X sont ensuite détectés et analysés, formant un spectre en énergie permettant de déterminer la composition chimique de l'échantillon (Figure 28).

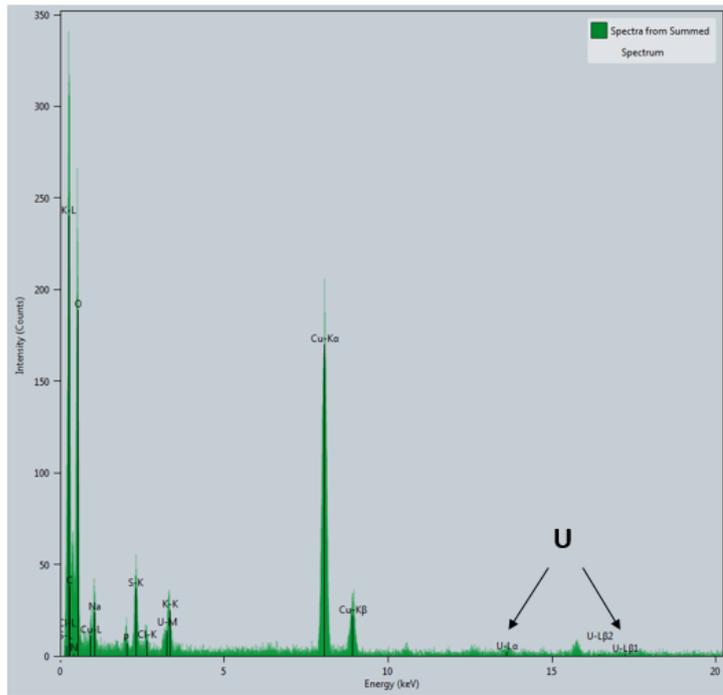


Figure 28 : Exemple d'un spectre EDS d'une coupe de cellules bactériennes exposées à l'uranium (Voir chapitre 5)

Des cartographies de la composition élémentaire, montrant la répartition spatiale des différents éléments dans l'échantillon, peuvent également être réalisées à partir de ces analyses EDS couplées à la STEM (Figure 29).

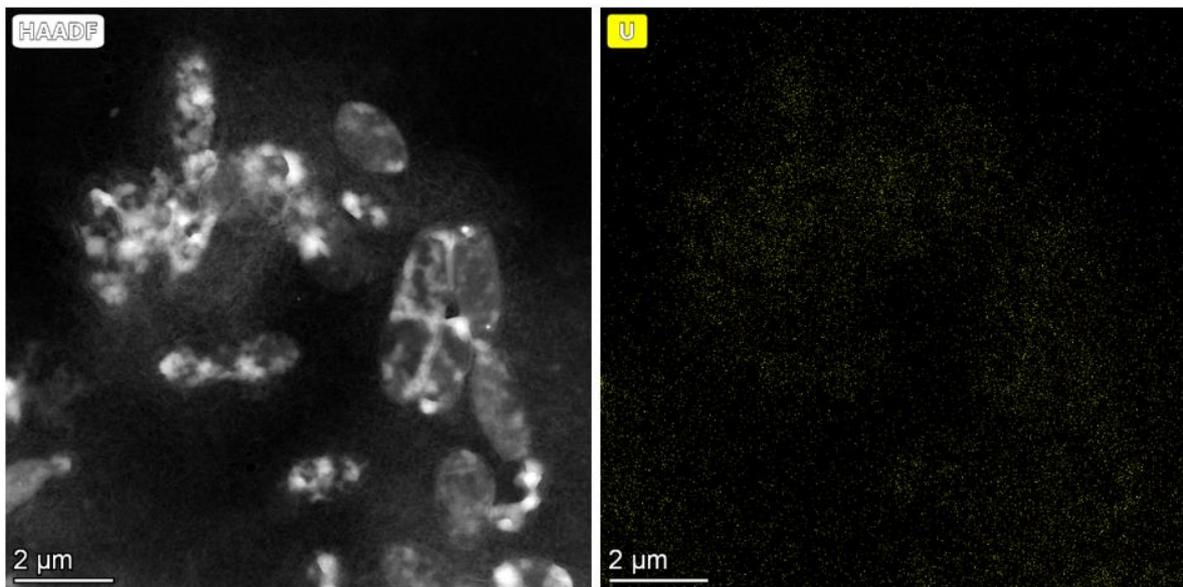


Figure 29 : Exemple d'une carte élémentaire d'une coupe de cellules bactériennes exposées à l'uranium (Voir chapitre 5)

2) Préparation des échantillons

Les analyses TEM et STEM/X-EDS ont été effectuées (1) sur des coupes ultrafines de cellules bactériennes, (2) sur des cellules bactériennes déposées directement sur grilles et (3) sur des coupes de cellules bactériennes cryofixées à l'isopentane. Les différents protocoles de préparation des échantillons avant observation sont détaillés ci-dessous :

1) : Les cellules bactériennes exposées à l'uranium ont été prélevées par centrifugation à 12 000rpm pendant 15 minutes à 4°C et lavées deux fois avec une solution de NaCl 0,9% afin d'éliminer au maximum les éléments du milieu. Les cellules ont été fixées dans du glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate 0,1M (pH 7,2). Après rinçage en tampon cacodylate 0,1M, les culots cellulaires ont été fixés pendant 2 heures dans 1% de tétroxyde d'osmium (OsO_4) dans du tampon cacodylate (0,1M). Ces étapes de fixation permettent de créer une réticulation artificielle afin de rendre les molécules insolubles dans l'eau et dans les solvants organiques, ainsi que de bloquer les systèmes enzymatiques (la structure de l'échantillon est figée). De plus, cette fixation permet de densifier la matière biologique afin de la rendre plus détectable sous le faisceau d'électron (les contrastes de phase et de diffusion créent l'image en MET).

Après ces étapes de fixation, les culots bactériens sont inclus dans de l'agarose 2%, permettant une meilleure manipulation des échantillons pour les étapes suivantes (NB : De la fixation jusqu'à l'inclusion en agarose, des centrifugations à 12000rpm pendant 3 min sont réalisées afin de culoter les bactéries). Les échantillons sont ensuite déshydratés par l'ajout d'une concentration croissante en éthanol, puis imprégnés et inclus dans une résine époxy polymérisée à 60°C pendant 48 heures. Enfin, les échantillons ont été finement sectionnés (70nm) à l'aide un couteau diamanté sur un ultramicrotome EM-Ultracut-ET (Leica Microsystems, Vienne, Autriche) puis déposés sur une grille de cuivre pour observation.

Des colorations négatives ont également été réalisées sur les suspensions bactériennes après les étapes de fixation. Pour cela, quelques gouttes de suspension ont été déposées sur des grilles membranées (préalablement ionisées négativement pour favoriser l'accrochage du matériel biologique et du contrastant). Ensuite, après élimination du surplus, une coloration immédiate avec un contrastant (ici le nanotungstène) a été réalisée. Cette coloration permet de

mettre en évidence et caractériser les cellules bactériennes par rapport au contrastant utilisé qui agit comme un fluide optiquement opaque.

2) : Après exposition des cellules bactériennes à l'uranium, elles ont été déposées directement sur une grille d'observation, dépôt pendant 1 minute et séchage en éliminant le surplus avec du papier filtre. Bien qu'il soit important que les échantillons soient très fins (environ 100nm d'épaisseur) pour permettre la transmission des électrons à travers, ce protocole a été réalisé afin d'éviter toute perte d'uranium lors des étapes de préparation des échantillons comme il a été supposé pour le protocole précédent (Voir chapitre 5).

3) : Après incubation avec l'uranium, et élimination du surnageant, les culots bactériens ont été déposés sur un pin (support de coupe). Les échantillons sont submergés dans l'isopentane à une température entre -135°C et -150°C pendant 30 secondes puis essuyés sur papier absorbant froid avant d'être stockés dans des tubes cryogéniques dans une cryothèque (-180°C). Cette cryofixation permet de conserver l'état natif des cellules bactériennes étudiées. Par la suite, les échantillons congelés sont découpés et sectionnés (100nm environ) dans un cryo-ultramicrotome EM CRyoUltracut-7 (Leica Microsystems, Vienne, Autriche) à une température entre -120°C et -150°C. Les sections coupées sont ensuite récupérées et déposées sur des grilles carbonées puis ramenées à température ambiante pour observation.

3) Acquisition des images

Pour les observations en TEM, les échantillons ont été examinées au microscope électronique en transmission Hitachi H7650 (HITACHI, Japon) à une tension d'accélération de 80kV et équipé avec une caméra Orius 11Mpixel (Ametek, France). Les images TEM ont été acquises à l'aide du logiciel Digital Micrograph (Ametek, France).

D'autre part, pour les analyses en STEM/X-EDS, les échantillons ont été examinées au microscope électronique en transmission Talos F200S G2 FEG (ThermoFischer, Pays-Bas) à une tension d'accélération de 200kV, équipé d'une caméra 4K*4K One View (Gatan, France). Le STEM à haute résolution était équipé d'un détecteur HAADF et de deux détecteurs de rayons X à dispersion d'énergie (X-EDS). Les paramètres opérationnels utilisés sont une ouverture du condenseur de 50µm (angle de convergence de 7,5 mrad), une taille de sonde de 6, un courant

d'environ 0,250nA pour optimiser la résolution spatiale et le taux de photons X (environ 300-1Kx coups/s) et une longueur de caméra de 260mm. Les images STEM et les spectres et cartes X-EDS ont été réalisés à l'aide du logiciel Velox (Thermofisher, Pays-Bas).

VII- Méthodes statistiques

Dans le cadre de cette thèse, les différentes analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 4.1.1 – R Core Team (<https://www.r-project.org/>)). Ces différentes analyses statistiques ont été réalisées pour répondre à différentes problématiques à l'aide de plusieurs tests ou méthodes statistiques décrites ci-dessous :

- *Test de comparaison de moyennes*

Un test de Student (t-test) a été réalisé pour comparer les moyennes de deux échantillons indépendants. Les conditions d'application de ce test ont été vérifiées (normalité et homoscedasticité). Ce test a été réalisé pour comparer les moyennes des indices de diversité obtenus pour chaque période d'échantillonnage dans chaque source minérale (Voir chapitre 3) et pour comparer les moyennes des taux de croissance de souches bactériennes en absence et présence d'uranium (Voir chapitre 5). Le risque α (seuil de significativité) a été fixé à 5%.

- *Analyse de la variance*

Des tests d'ANOVA (ANalysis Of VAriance) ou Kruskal-Wallis (selon les conditions d'application) ont été utilisés pour comparer les moyennes des différents indices de diversité mesurés entre chaque source étudiée (Chapitre 3) ou chaque couche de sol échantillonnée (Chapitre 4). Ces tests permettent d'observer s'il existe une différence significative entre les indices de diversités mesurés dans les sources minérales ou la carotte de sol. Les conditions d'application pour réaliser l'ANOVA ont été vérifiées (normalité, homoscedasticité et indépendance des résidus). Par la suite, un test post-hoc de Tukey (pour ANOVA) et de Dunn (pour Kruskal-Wallis) ont été réalisés pour comparer les moyennes de chaque modalité deux à deux. Ces tests permettent de déterminer les différences significatives de diversité entre les différentes sources et couches de sol échantillonnées. Le risque α (seuil de significativité) a été fixé à 5%. Ces tests ont été réalisés à l'aide du package *multcom* (Hothorn et al., 2008).

- *Analyse en composante principale (ACP)*

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour observer les relations potentielles entre les paramètres physicochimiques des sources minérales mesurés et la répartition des différents échantillons des sources minérales selon ces paramètres physicochimiques mesurés (Voir chapitre 3). L'analyse de l'ACP a été effectuée à partir du package *FactoMineR* (Lê et al., 2008) du logiciel R. Pour cette analyse, seuls les éléments mesurés aux dessus des limites de détection, et pour lesquelles il n'y avait aucune valeur manquante pour chaque source lors des deux campagnes, ont été gardés (Tableau 4 et Tableau 5)

- ***Analyse discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA)***

L'analyse discriminante des moindres carrés partiels est un modèle linéaire multivarié qui permet de rechercher les composantes qui séparent le mieux les groupes d'échantillons. En particulier, la sPLS-DA (Sparse Partial Least Square Discriminant Analysis) permet de sélectionner les variables qui discriminent le mieux ces groupes. Pour cela, le nombre de composantes et de variables à inclure dans le modèle sPLS-DA est optimisé en utilisant la fonction « *tune.splsda* » qui utilise une validation croisée répétée pour sélectionner ces paramètres. L'analyse de la sPLS-DA a été effectuée à partir du package *mixOmics* (Rohart et al., 2017). La sPLS-DA a été réalisée dans le but d'identifier les variables (dans notre cas les OTUs) qui conduisent à une discrimination entre les échantillons des sources (Chapitre 3) ou des couches de sol de la carotte de Rophin (Chapitre 4). Ce test permet de déterminer si le profil des communautés bactériennes de ces différents échantillons est différent selon des OTUs prédominantes dans ceux-ci.

- ***Régression des moindres carrés partiels (PLS)***

La régression des moindres carrés partiels est une analyse multivariée qui permet de mettre en relation deux jeux de données. Contrairement à l'ACP qui maximise la variance des composantes d'un seul ensemble de données, la PLS maximise la covariance entre les composantes de deux ensembles de données. En particulier, la méthode sPLS (Sparse Partial Least Squares) a été mis au point pour améliorer l'interprétabilité des résultats obtenus dans le cas de données « omics » (Lê Cao et al., 2008). Pour cela, le nombre de composantes et de variables (pour les deux jeux de données) à inclure dans le modèle de la sPLS doit être optimisé en utilisant la fonction « *tune.spls* » qui utilise une validation croisée répétée pour sélectionner ces paramètres. L'analyse de la sPLS a été effectuée à partir du package *mixOmics* (Rohart et al., 2017). La sPLS a été réalisée dans le but d'observer si des OTUs spécifiques de différents

échantillons (sources ou couches de sol) étaient corrélées aux paramètres physicochimiques mesurés dans ceux-ci. Cette analyse permet par conséquent d'intégrer les tables d'OTUs et les paramètres physicochimiques, mesurés sur les mêmes échantillons, et extraire les variables corrélées.

Chapitre 3 : Etude des
communautés bactériennes
de sources minérales
naturellement radioactives

I- Contexte général et objectifs

Ce 3^{ème} chapitre est axé sur la caractérisation des communautés bactériennes présentes dans des sources minérales naturellement radioactives dans la région du Massif Central (France). Comme décrit dans le chapitre 2, ces sources sont des écosystèmes particuliers, caractérisées par des concentrations en radioéléments élevées. Dans ces environnements, les micro-organismes, dont les bactéries, s'y sont développés durant des milliers d'années. Pour s'adapter et survivre à ces niveaux élevés de rayonnement, les communautés microbiennes ont mis en place divers mécanismes, afin de favoriser leur croissance et leur survie, donnant lieu à des populations radiotolérantes dans de tels sites (Chandwadkar et al., 2018 ; Shuryak, 2019). De nombreuses études ont caractérisé les communautés bactériennes présentes dans des environnements contaminés en radioéléments liés aux activités humaines (Chapon et al., 2012; Elias et al, 2003; Hoyos Hernandez et al., 2019; Jaswal et al., 2019; Li et al., 2018; Mumtaz et al., 2018; Radeva et al., 2013; Yan and Luo., 2015; Xu et al., 2010; Zirnstein et al., 2012). Cependant très peu se sont intéressées aux environnements naturellement caractérisés par une forte radioactivité (Mondani et al., 2011 ; Nayak et al., 2021).

Dans ce contexte, l'étude des communautés bactériennes de sources minérales naturellement radioactives du Massif Central a été réalisée dans le cadre de cette thèse. Ces travaux de thèse s'inscrivent au sein du projet TIRAMISU (biodiversiTy In RadioActive Mineral SoUrces), de la " Zone Atelier Territoires Uranifères dans l'Arc Hercynien " (ZATU). L'un des principaux objectifs de ce projet TIRAMISU est de caractériser la diversité microbienne présente dans diverses sources minérales radioactives du Massif Central (France). Le Massif Central est une région constituée de formations géologiques riches en uranium (massif granitique), bien connue pour ses sources minérales naturellement radioactives (Beaucaire et al., 1986 ; Ielsch et al., 2017 ; Risler, 1974). Par conséquent, les communautés microbiennes qui se développent dans ces sources ont été et sont soumises à des pressions de sélection, résultant d'une adaptation à des conditions physico-chimiques très spécifiques sur de très longues périodes. C'est la raison pour laquelle, dans le cadre des travaux de ma thèse, la composition et la diversité des communautés bactériennes présentes dans ces sources ont été analysées et définies finement grâce aux techniques de séquençage haut débit en ciblant le gène de l'ARN 16S (Metabarcoding). A notre connaissance, aucune étude dans la littérature n'a caractérisé les communautés bactériennes de sédiments de sources minérales naturellement chargées en radioéléments démontrant l'originalité de cette étude.

Dans le cadre de cette étude, les sédiments de 5 sources minérales naturellement radioactives du Massif central (Bard, Dourieux, Graviers, 3 Sauts et Montagne), aux concentrations en radioéléments variables, ont été échantillonnées à l'automne 2019 et au printemps 2020. L'hypothèse initiale émise est que l'exposition à très long terme des communautés bactériennes aux radionucléides présents dans ces sources a conduit à une sélection de certaines populations bactériennes résistantes permettant la mise en place d'une communauté tolérante à ces conditions particulières. De plus, les paramètres physicochimiques, dont les concentrations en métaux et radionucléides, ont été mesurés dans chacune des sources, afin de discriminer les effets de chacun d'entre eux sur ces communautés bactériennes.

L'objectif cette étude est de répondre aux questions suivantes :

- Existe-t-il une différence de communautés bactériennes entre les différentes sources étudiées ayant des concentrations variables en radioéléments ?
- Est-ce que ces radionucléides, comparés aux autres paramètres physico-chimiques, sont des « drivers » de la composition des communautés bactériennes ?
- Est-ce qu'une évolution de ces communautés au cours de deux saisons est observée ?

Ces résultats permettront donc, à travers une approche multidisciplinaire, de caractériser d'un point de vue biologique (communautés bactériennes), mais aussi d'un point de vue physico-chimique (incluant les éléments majeurs, métaux et radionucléides) plusieurs sources minérales naturellement radioactives, à deux saisons différentes.

II- Caractérisation des profils physico-chimiques et bactériens des sources minérales naturellement radioactives échantillonnées

1) Profils physico-chimiques des sources étudiées

Afin de déterminer si la présence de radioéléments dans ces sources minérales, ou d'autres facteurs environnementaux, ont un impact sur les communautés bactériennes présentes, les profils physico-chimiques de ces sources ont été caractérisés le plus précisément possible. La mesure des paramètres physicochimiques est réalisée par la collaboration TIRAMISU, dans le cadre des études menées sur ces sources minérales. Des échantillons d'eau et de sédiments ont été prélevés en octobre 2019 et juin 2020 en triplicata dans les 5 sources étudiées, à savoir les sources de Bard, Dourieux, Gravier, 3 Sauts et Montagne (Voir chapitre 2).

Le premier objectif était de déterminer si les sources échantillonnées ont des profils physico-chimiques différents. Pour voir s'il existe une différence de profils entre ces sources, une ACP (Analyse en Composante Principale) a été réalisée afin d'observer la répartition des sources selon les paramètres physico-chimiques mesurés qui discriminent le plus ces sources (voir chapitre 2). Suite à des problèmes lors de l'échantillonnage, la source de 3 Sauts n'a pu être caractérisée pour la campagne de juin 2020. De ce fait, il a été décidé de garder et analyser uniquement les 4 autres sources pour la campagne de juin 2020. Les mesures physico-chimiques utilisées pour cette étude, dans l'eau et les sédiments des 5 sources (Bard, Dourieux, Gravier, 3 Sauts et Montagne) en octobre 2019, et des 4 sources (Bard, Dourieux, Gravier et Montagne) en juin 2020 sont rapportées dans les Tableau 4 et Tableau 5 (Chapitre 2).

L'analyse de l'ACP a été réalisée sur 43 variables physico-chimiques et 27 échantillons de sédiments des sources des deux campagnes d'échantillonnage. Afin de rendre les variables comparables entre-elles, elles ont été préalablement normalisées. Par la suite, il est important de définir le nombre de composantes à sélectionner. Les 2 premiers axes de l'analyse expriment 62,25% de la variance totale (44,03% pour le premier axe et 18,22% pour le second axe). Le premier plan représente donc bien la variabilité contenue dans une grande part du jeu de données. Du fait de ces observations, il n'est pas nécessaire d'interpréter les dimensions suivantes dans l'analyse.

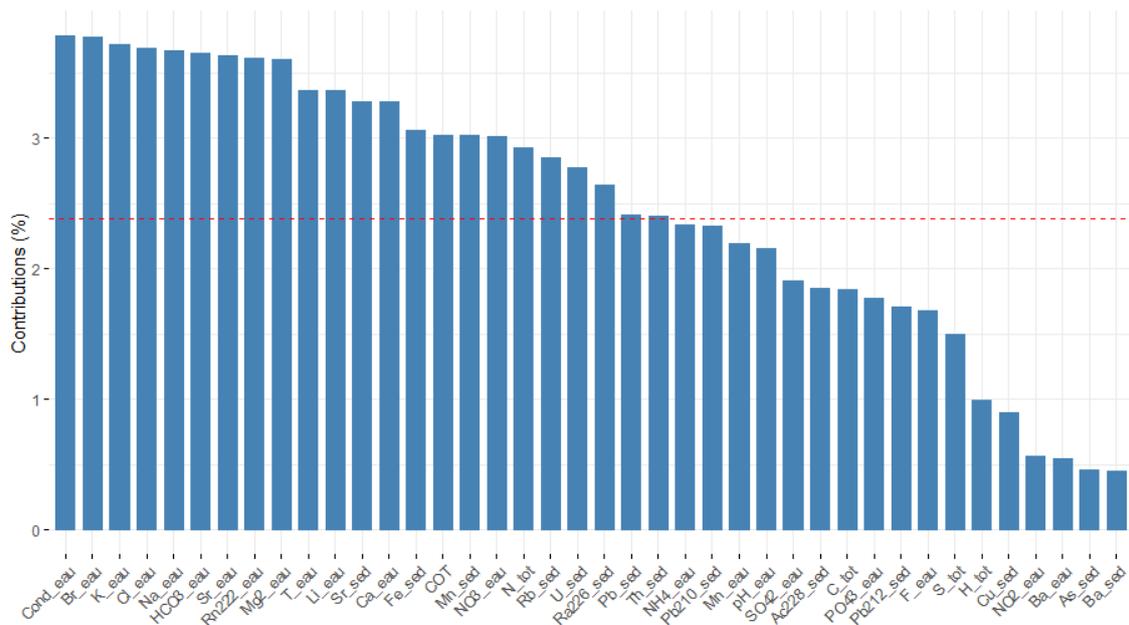


Figure 30: Histogramme de la contribution (en %) de chaque paramètre physico-chimique aux composantes 1 et 2

La dernière partie avant de constituer le graphe de l'ACP, est de sélectionner les variables qui contribuent le plus pour expliquer la variabilité dans le jeu de données. Pour cela, l'histogramme ci-dessus (Figure 30), présente la contribution de chaque variable pour les deux premières composantes. La ligne en pointillé rouge indique la contribution moyenne attendue. Une variable avec une contribution supérieure à ce seuil est considérée comme importante pour contribuer aux deux premières composantes. De ce fait, 23 variables (Conductivité, Br⁻_eau, K⁺_eau, Cl⁻_eau, Na⁺_eau, HCO₃⁻_eau, Sr_eau, ²²²Rn_eau, Mg²⁺_eau, Température, Li²⁺_eau, Sr_sed, Ca²⁺_eau, Fe_sed, COT, Mn_sed, NO₃⁻_eau, Ntot_sed, Rb_sed, U_sed, ²²⁶Ra_sed, Pb_sed et Th_sed), qui contribuent le plus aux deux premières composantes, ont été sélectionnées pour l'ACP.

Le biplot de l'ACP représentant la répartition des sources en fonction des paramètres physico-chimiques est représenté sur la Figure 31, ci-dessous :

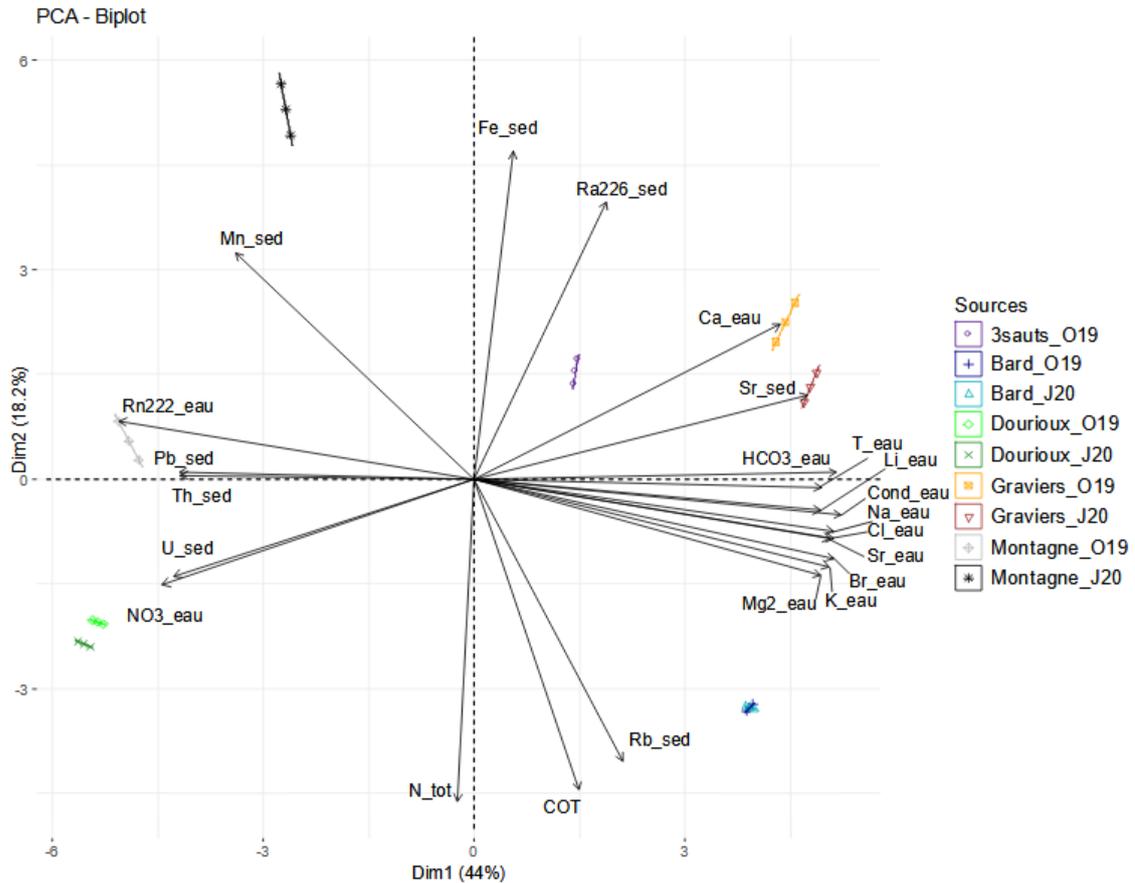


Figure 31 : Analyse en composantes principales (ACP) montrant la distribution des sources échantillonnées en octobre 2019 et juin 2020 (sauf pour 3 sauts : pas de données pour juin 2020) en fonction des 23 variables physico-chimiques qui contribuent le plus à expliquer cette distribution

D'après le tracé de l'ACP obtenu (Figure 31), les sources sont significativement séparées les unes des autres et présentent donc des profils physico-chimiques différents au cours des deux campagnes réalisées. Les sources naturelles sont influencées par leur circulation souterraine profonde et leur composition chimique dépend principalement des interactions eau-roche. Différents processus ont lieu lors de la remontée des eaux profondes, tels que la dissolution, l'échange d'ions, la précipitation, conduisant à une modification de la composition chimique. Enfin, le plus souvent, les sources naturelles sont des mélanges d'eau thermale et d'eau de surface, cette dernière étant pauvre en minéraux et conduisant à une dilution et à une modification de la composition de l'eau profonde (Beaucaire et al., 1986 ; Beauger et al., 2022; Risler et al., 1974, Négrel et al., 2000).

En particulier, les sources des 3 sauts, de Bard et Gravières sont associées à une forte concentration en éléments majeurs (Li^{2+} , Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , K^+ , Mg^{2+} , Br^- , Ca^{2+}) et en Sr (eau et sédiments), à une conductivité et une température élevées, ainsi qu'à de faibles concentrations en ^{222}Rn , U, Th, Pb et nitrates. La source de Gravières est caractérisée par une concentration plus élevée en ^{226}Ra , Sr (sédiment) et Ca^{2+} tandis que la source de Bard se distingue par une concentration plus élevée de Ntot, COT et Rb. De nombreuses sources du Massif Central sont connues pour être riches en minéraux (Fouillac, 1983). En particulier, les sources de la région du Cézallier (Bard et 3 Sauts) sont connues pour leur composition chimique dominée par Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , Na^+ et couramment riches en éléments traces tels que Sr, Fe, etc. (Beucaire et al., 1987 ; Beauger et al., 2018 ; Cornu et al., 2000 ; Fouillac, 1983, Négrel et al., 2000). Les sources de la Limagne centrale et méridionale, dont celles de Gravières, sont également caractérisées par de fortes concentrations en Ca^{2+} , Mg^{2+} et HCO_3^- (Fouillac, 1983 ; Risler et al., 1974), mais aussi en éléments traces comme le strontium (Négrel et al., 2000).

D'autre part, les sources de Montagne et Dourieux sont opposées aux autres sources principalement par l'axe 1, et forment un cluster dans le plan factoriel à gauche. Ces deux sources se distinguent par de fortes concentrations/activités en radioéléments (Th, U et ^{222}Rn), de fortes concentrations en plomb et nitrates, de faibles concentrations en éléments majeurs (Li^{2+} , Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , K^+ , Mg^{2+} , Br^- , Ca^{2+}), Sr (dans l'eau + les sédiments), et une conductivité et une température plus faibles. La source de Dourieux se distingue de celle de Montagne par une concentration plus élevée en uranium, ainsi que par une concentration élevée et constante en nitrates pendant les deux saisons (Tableau 4 et Tableau 5). Il apparaît également que la concentration en cuivre de Dourieux a varié de manière significative entre les deux campagnes de mesures (Cu : 0,07 et 43,58 $\mu\text{g/g}$ respectivement pour 2019 et 2020). Une variabilité des paramètres physico-chimiques est également observée pour Montagne, entre les deux campagnes de prélèvements. En juin 2020, la source de Montagne se distingue par une plus forte concentration en Mn, Fe, ^{226}Ra et éléments majeurs, ainsi qu'une plus faible concentration en nitrates par rapport à octobre 2019 (Tableau 4 et Tableau 5).

Ces sources sont très enrichies en uranium et en thorium par rapport aux autres sources étudiées. En effet, la présence de tobernite (minérale composée de phosphate hydratée d'uranyle) avait été observée dans du quartz près du hameau de Dourieux, mettant en évidence de nombreuses zones radioactives dans cette région (Alsac et al., 1988). De manière semblable, la source de Montagne est localisée à 3,75 km d'une ancienne mine d'uranium, ce qui confirme la présence de filons d'uranium autour de cette zone (Millan et al., 2019). De plus, Beaucaire et

al. en 1986 ont également observé des sources définies par une faible concentration en éléments majeurs, mais une forte concentration en U dans la région du Massif Central. L'uranium serait libéré lors de la remontée de l'eau vers l'émergence. En effet, le refroidissement lent de l'eau dans les fissures du granite favoriserait la dissolution de l'uranium dans l'eau. De plus, ces eaux très diluées seraient enrichies en uranium, dû à des dissolutions de surface (Beaucaire et al., 1986). Par ailleurs, les fortes concentrations en Fe et Mn mesurées à Montagne en 2020, pourraient également être liées à la forte concentration en uranium mesurée dans ces sources. En effet, le dégazage du CO₂ à l'émergence de la source conduit à une modification de l'état d'oxydation de ces eaux, ce qui favorise la formation d'oxydes de fer et de manganèse (Beaucaire et al., 1986 ; Casanova et al., 1999). Ces oxydes de fer et de manganèse ont une forte capacité à adsorber l'uranium et favorisent la mobilité de cet élément dans les eaux de surface (Stubbs et al., 2006).

Concernant l'activité du radon, la plus forte activité a également été mesurée dans ces deux sources (moyenne de 3481 et 3599 Bq/l pour Dourieux et Montagne respectivement, pour les deux prélèvements effectués). Ces valeurs sont beaucoup plus élevées que la moyenne géométrique des concentrations de radon mesurées dans les eaux souterraines et les eaux de source, compilées à partir de la littérature par Girault et al., 2018. Elles sont également supérieures à d'autres mesures de radon effectuées dans des eaux de sources. En effet, pour des eaux de sources naturelles à proximité de Saratoga Springs (USA), la concentration en ²²²Rn variait de 1 à 24 Bq/l (Kitto et al., 2004). Par ailleurs, dans la région de Mahallat en Iran, caractérisée par de fortes émissions de radon, cinq sources hydrothermales ont été caractérisées pour leur teneur en ²²²Rn dans l'eau : les concentrations moyennes en ²²²Rn variaient de 145 à 2731 Bq/L (Sohrabi, 1998). Ces fortes activités en radon dans les sources de Dourieux et de Montagne pourraient être attribuées à la présence de roches riches en uranium dans la zone où se trouvent les eaux de ces sources, comme cela a été démontré pour des eaux de sources en Espagne et au Venezuela (Fonollosa et al., 2016 ; Horváth et al., 2000). Les eaux de ces sources traversant ces roches riches en uranium vont par conséquent se charger en radon, issu des désintégrations radioactives successives de la chaîne de désintégration de l'²³⁸U, et faciliter son transfert du sous-sol vers la surface (Girault et al., 2018 ; Ielsch et al., 2016). De plus, la source de Montagne est connue pour être l'une des plus radioactives de France, avec une activité radon documentée de 134 nCi/l (équivalent à 4958 Bq/l) (Risler, 1974).

Enfin, la présence d'une forte concentration en nitrates dans ces sources, qui est un indicateur anthropique, montre que Montagne et Dourieux sont affectées par des activités

humaines. Des concentrations élevées en nitrates, ainsi que d'autres indicateurs anthropiques, ont déjà été observées dans la source de Montagne, située dans une zone agricole (Baker et al., 2022, Millan et al., 2019). Les auteurs avaient déterminé que la forte concentration en nitrates était liée aux activités agricoles du bassin versant et que la configuration du site de Montagne était favorable au mélange des eaux de la source et des eaux du bassin versant, chargées en nitrates (Baker et al., 2022, Millan et al., 2019). Comme le démontrent les mesures de conductivité et d'éléments majeurs plus élevées, ainsi que les mesures de nitrates plus faibles obtenues en 2020 par rapport à 2019 (Tableau 5) la source de Montagne a également été fortement affectée par les précipitations dans la période de nos mesures, comme observé précédemment (Baker et al., 2022, Millan et al., 2019). En octobre 2019, ces précipitations ont conduit à une diminution des éléments majeurs et de la conductivité dans la source de Montagne, en raison de phénomènes de dilution. De plus, une augmentation des nitrates a été observée dans cette source en raison du lessivage par ruissellement de ce composé chimique utilisé dans les exploitations agricoles. Il est également probable que le bassin versant de la source de Dourieux joue un rôle prépondérant dans la composition de l'eau de la source, car celle-ci est également située dans une forte zone agricole, et contient de fortes concentrations en nitrates. Par ailleurs, la forte augmentation de la concentration en cuivre entre les campagnes 2019 et 2020 (Cu : 0,07-43,58 $\mu\text{g/g}$ respectivement) pourrait également être due à la lixiviation du cuivre, très utilisé comme composé antimicrobien en agriculture (Lamichane et al., 2018), par les eaux de ruissellement qui se sont mélangées à l'eau de la source de Dourieux en juin 2020.

En conclusion, d'après les observations réalisées sur les sources étudiées lors des deux campagnes, ces sources présentent des profils physico-chimiques différents et représentent des biotopes distincts, dont deux qui se distinguent par de fortes concentrations/activités en radioéléments (Montagne et Dourieux).

2) Composition et diversité des communautés bactériennes dans les échantillons de sédiments de sources minérales

Comme décrit dans le chapitre 2, les communautés bactériennes indigènes dans les sédiments ont été analysées par séquençage haut débit à partir d'extraits d'ADN des échantillons de sédiments prélevés pour chacune des sources étudiées. Afin d'identifier ces communautés bactériennes, le gène de l'ARN 16S a été ciblé et amplifié par PCR. Les produits de PCR ont été par la suite purifiés puis séquencés à l'aide d'un séquenceur Illumina Miseq (Plateforme Get-Plage de l'INRAE de Toulouse). Un total de 297 387 séquences pour 9 068 OTUs a été obtenu pour les campagnes d'octobre 2019 et juin 2020.

a) Pré-filtrage de la table d'OTUs

Une étape de préfiltrage a été réalisée sur l'ensemble de la table d'OTUs pour les deux campagnes d'échantillonnage, afin d'obtenir une table d'OTUs plus représentative pour chaque campagne. Cette étape de préfiltrage consiste à éliminer les OTUs dont la proportion sur l'ensemble des échantillons était inférieure ou égale à 0,01% de la totalité des OTUs. Cette étape permet d'éviter des résultats erronés dans l'analyse statistique en aval (Le Cao et al., 2016). Après préfiltrage des données, 86 343 séquences pour 1 438 OTUs ont été conservés pour la campagne d'octobre 2019, et 64 249 séquences pour 1 366 OTUs pour la campagne de juin 2020. La conformité des tables d'OTUs a été vérifiée par l'analyse de la raréfaction. Cette méthode, élaborée par Sanders (1968), permet d'évaluer la diversité au sein d'un échantillon et de constater que la profondeur de séquençage est correcte pour chaque échantillon. Les courbes de raréfaction ont atteint un plateau pour chaque échantillon, lors des deux campagnes, signifiant que le nombre de séquences conservées a permis de conserver la majorité des phylotypes, permettant donc d'avoir une bonne vision de la diversité globale des communautés étudiées (Figure 32).

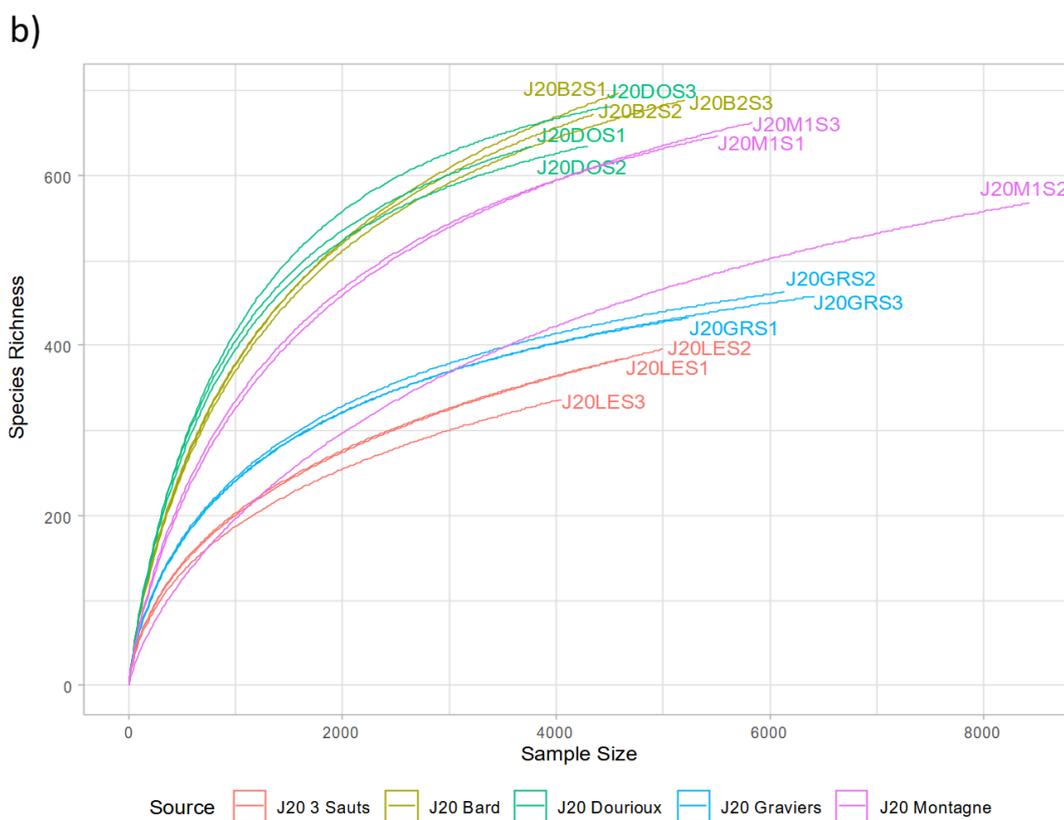
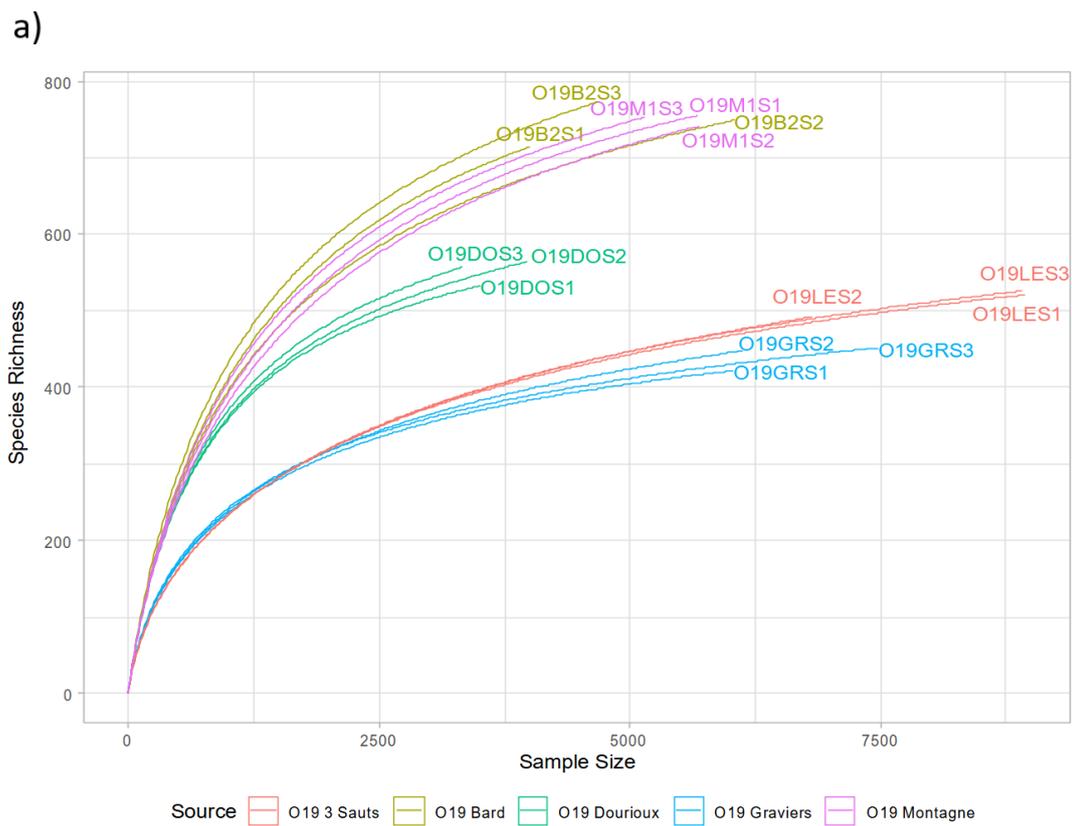


Figure 32 : Courbes de rarefaction des OTUs bactériennes pré-filtrées pour chaque échantillon, a) Lors de la campagne de 2019; b) Lors de la campagne de 2020

b) Mesure des indices de diversité alpha

Evaluer la diversité au sein de ces sources minérales est complexe et nécessite d'utiliser des indices de diversité pour tenter de la quantifier. La diversité alpha, qui renseigne sur la diversité au sein d'un échantillon, a été mesurée à l'aide de deux indices de diversité (Tableau 10) : la richesse spécifique avec l'indice de Chao1 et la diversité bactérienne avec l'indice de Shannon.

Tableau 10 : Nombre d'OTUs observées, ainsi que les indices de diversité alpha mesurés (Chao1 = richesse et Shannon = diversité), dans les échantillons de sédiments des sources échantillonnées en octobre 2019 et juin 2020. Pour les indices de diversité, les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type ($n=3$).

Source	OTUs observées		Chao1 (Richesse)		Shannon (Diversité)	
	Octobre	Juin	Octobre	Juin	Octobre	Juin
	2019	2020	2019	2020	2019	2020
Bard	745 \pm 24	686 \pm 10	898,29 \pm 50,51	837,29 \pm 35,75	5,94 \pm 0,07	5,72 \pm 0,02
Dourioux	551 \pm 13	650 \pm 22	658,43 \pm 34,59	732,06 \pm 16,68	5,71 \pm 0,01	5,86 \pm 0,04
Graviers	440 \pm 13	451 \pm 13	533,85 \pm 23,66	542,74 \pm 17,68	4,93 \pm 0,05	4,88 \pm 0,03
3 Sauts	513 \pm 15	373 \pm 26	640,04 \pm 10,51	556,18 \pm 57,61	4,85 \pm 0,01	4,49 \pm 0,07
Montagne	750 \pm 6	626 \pm 42	877,26 \pm 26,04	768,04 \pm 24,34	5,83 \pm 0,04	4,57 \pm 0,95

Les tests ANOVA ou Kruskal-Wallis réalisés ont démontré que, pour les deux campagnes d'échantillonnage, les indices de diversité alpha mesurés (Shannon et Chao1) sont significativement différents entre les sources étudiées (Figure 33 et Figure 34). De plus, les tests post hoc effectués ont permis de déterminer que, pour la campagne de 2019, les diversités alpha (Shannon et Chao1) des sources de Montagne et Dourioux, caractérisées par de plus fortes concentrations en radioéléments, n'étaient pas significativement plus faibles que dans les 3 autres sources (Bard, 3 Sauts et Graviers). La source de Montagne, avec la source de Bard, avait même les indices de diversité et de richesse les plus significativement élevés par rapport aux autres sources. En revanche, la source de Graviers a montré la plus faible diversité et richesse bactérienne.

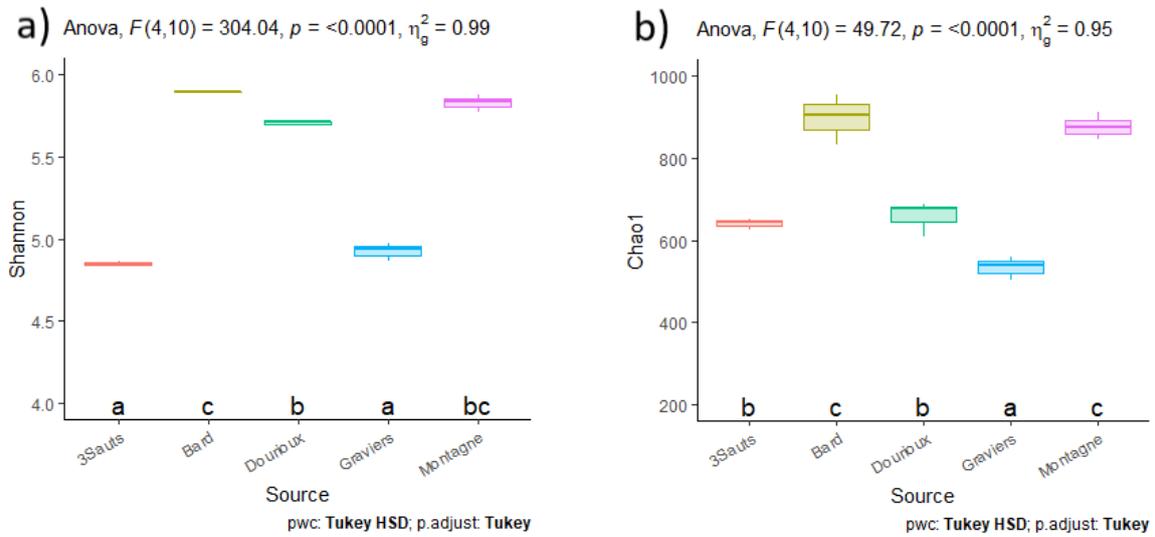


Figure 33 : Comparaison des indices de diversité : a) de Shannon ; b) de Chao1 entre les 5 sources étudiées pour la campagne d'octobre 2019 visualisés en boxplots. Les sources ayant des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$.

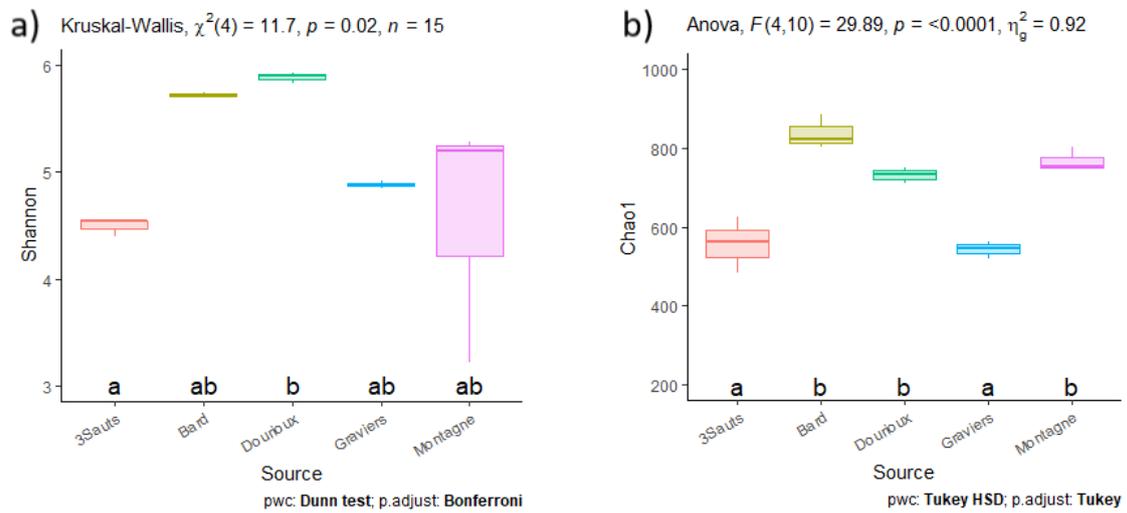


Figure 34 : Comparaison des indices de diversité : a) de Shannon; b) de Chao1 entre les 5 sources étudiées pour la campagne de juin 2020 visualisés en boxplots. Les sources ayant des lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$.

Pour la campagne de juin 2020, les indices de diversité mesurés dans les deux sources les plus radioactives, n'étaient également pas significativement plus faible que dans les autres sources. Au contraire, la source de Dourieux avait même l'indice de diversité de Shannon le plus significativement élevé, suivi de la source de Bard, de Graviers, de Montagne et de 3 Sauts. Pour la richesse spécifique Chao1, la source de Bard avait l'indice le plus élevé suivi de la source de Montagne, la source de Dourieux, de 3 Sauts et enfin la source de Graviers.

Ces résultats démontrent que la présence de radionucléides n'a pas conduit à une diminution de la diversité et de la richesse bactérienne dans les sources de Montagne et Dourieux (caractérisées par une activité en radon et des concentrations en radioéléments plus élevées Tableau 4 et Tableau 5) comparées aux autres sources pour les deux périodes d'échantillonnage. Il est vrai que la présence de radioéléments à des concentrations élevées peut induire un impact sur la diversité et la richesse bactériennes (Rogiers et al., 2021). En effet, de nombreuses études ont observé une diminution de la diversité dans des sites contaminés en radioéléments (Rogiers et al., 2021; Suriya et al., 2017; Hoyos Hernandez et al., 2019). Cependant, d'autres études ont déterminé qu'il n'existait pas une association claire entre une contamination en radioéléments et la diversité bactérienne (Li et al., 2018 ; Sitte et al., 2015), voire que la diversité bactérienne augmentait (Radeva et al., 2013; Theodorakopoulos et al., 2017 ; Zeng et al., 2020). Il paraît donc difficile d'observer une réponse universelle des communautés microbiennes indigènes à une contamination en radionucléides (Rogiers et al., 2021). De plus, la majorité de ces études traitant des effets des radioéléments sur les communautés bactériennes sont liées à une contamination en uranium dans un contexte minier et, par conséquent, une exposition à cette contamination depuis quelques décennies seulement. Or, dans le cadre de notre étude, les communautés sont exposées aux radioéléments depuis des milliers d'années. Il est alors envisageable que ces communautés bactériennes se soient adaptées à ces conditions conduisant à une richesse et diversité élevées dans ces sources de Dourieux et Montagne. Les bactéries résistantes et tolérantes aux radioéléments ont pu modifier leurs environnements permettant à d'autres bactéries ayant des métabolismes variés de se développer en utilisant des substrats libérés par ces populations bactériennes résistantes.

c) *Analyse taxonomique des communautés bactériennes des sédiments des sources minérales*

L'analyse de la composition taxonomique des échantillons de sédiments des sources a révélé la présence de 28 et 31 phylums différents, représentés par 169 et 173 ordres bactériens, pour les campagnes d'octobre 2019 et juin 2020, respectivement. La Figure 35, ci-dessous, présente les phylums majoritaires obtenus pour chaque campagne d'échantillonnage.

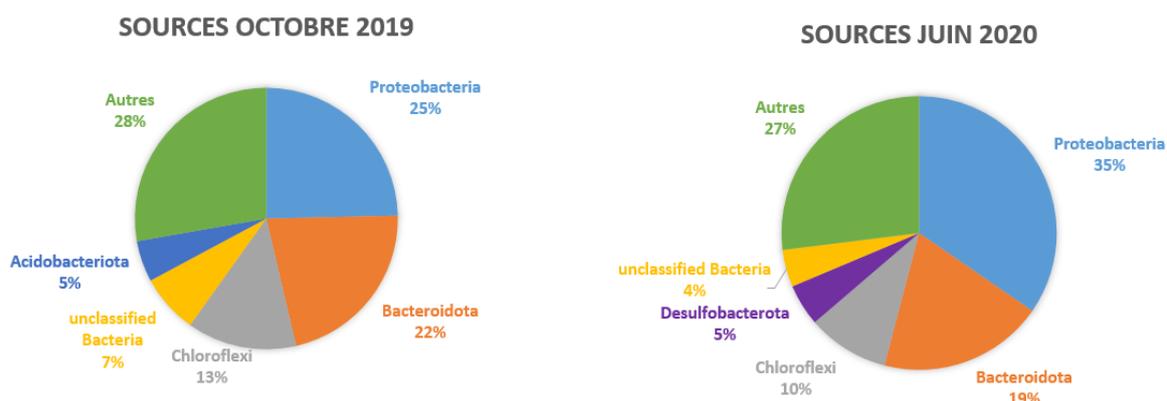


Figure 35 : Abondance relative des phylums majoritaires obtenus lors des campagnes d'octobre 2019 et juin 2020

Lors des campagnes d'octobre 2019 et juin 2020, les trois phylums majoritaires appartenaient aux *Proteobacteria*, *Bacteroidota* et *Chloroflexi*. Les *Proteobacteria* et les *Bacteroidota* ont également été trouvés majoritairement dans des biofilms de plusieurs sources thermales souterraines dans les Alpes, qui contenaient du radium 226 et du radon 222 (Weidler et al., 2007), démontrant la capacité des espèces bactériennes appartenant à ces phylums à se développer dans ces sources minérales en présence de radionucléides. Les phylums des *Actinobacteriota*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobiota*, *Cyanobacteria*, *Desulfobacterota*, *Patescibacteria*, *Planctomycetota*, *Nitrospirota*, *Spirochaetota* et *Myxococcota* ont été détectés dans tous les échantillons avec des abondances relatives moyennes supérieures à 1%, mais n'excédant pas 5% au cours des deux saisons.

Une analyse de la composition taxonomique par source a ensuite été réalisée, pour les deux campagnes d'échantillonnage (Figure 36). Le phylum des *Proteobacteria* représente entre 14,92% dans la source 3 Sauts en 2019 à 54,43% dans la source de Montagne en 2020. Au niveau de l'ordre, les *Proteobacteria* sont représentés par *Burkholderiales* (42,10% dans J20 Montagne), *Rhizobiales* (11,18% dans O19 Bard), *Rhodobacterales* (5,22% dans O19 Gravier)

et *Enterobacterales* (5,95% dans J20 Montagne). Le phylum des *Bacteroidota* (représentant au minimum 10.93% dans O19 Dourieux à 24.73% dans O19 Montagne) était majoritairement représenté par l'ordre *Bacteroidales* (17,20% dans J20 Bard), suivi des *Flavobacteriales* (7,95% dans J20 3 Sauts), des *Ignavibacteriales* (7,62% dans O19 3 Sauts) et des *Chitinophagales* (6,12% dans J20 Dourieux). Le phylum des *Chloroflexi*, (représentant de 6,17% dans O19 Bard à 27,49% dans J20 3 Sauts) était uniquement représenté par l'ordre *Anaerolineales*, retrouvée majoritairement dans la source de 3 Sauts (25,34% en J20) et Gravières (10,91% en O19). Cette analyse révèle que l'abondance relative des différents phylums et ordres identifiés varient très fortement d'une source à l'autre, mais également entre les deux périodes d'échantillonnage pour une même source.

Ces phylums *Proteobacteria*, *Bacteroidota* et *Chloroflexi* sont typiquement observés dans les sédiments ou eaux douces de systèmes aquatiques (Beier et al., 2007 ; Boucher et al., 2006 ; Cole et al., 2013 ; Jackson and Weeks, 2008 ; Methé et al., 1998 ; Nold et Zwart, 1998). En effet, ces phylums regroupent de nombreuses espèces ubiquistes, regroupant un niveau de diversité morphologique, physiologique et métabolique élevé, leur permettant de se développer dans ces différentes sources minérales aux profils physico-chimiques variées (Spain et al., 2009 ; Thomas et al., 2011). Par exemple, *Chloroflexi* et *Bacteroidetes* sont connus comme étant des acteurs principaux dans la transformation de la matière organique dans les sédiments d'eau douce (Jroundi et al., 2020 ; Thomas et al., 2011).

De plus, il est connu que la composition bactérienne de sédiments est dépendante de divers facteurs environnementaux, comme par exemple la teneur en oxygène ou la disponibilité en nutriments (Jroundi et al., 2020 ; Lopez-Fernandez et al., 2021). Or, ces sources sont définies par des paramètres physicochimiques spécifiques à chacune et représentent des biotopes distincts, dont certaines sont caractérisées par une concentration/activité en radioéléments plus élevée. Par conséquent, les variations de la composition bactérienne observées entre les sources et les deux périodes d'échantillonnage pourraient être liées aux différents paramètres physicochimiques définissant chaque source, dont les fortes concentrations en radioéléments observées.

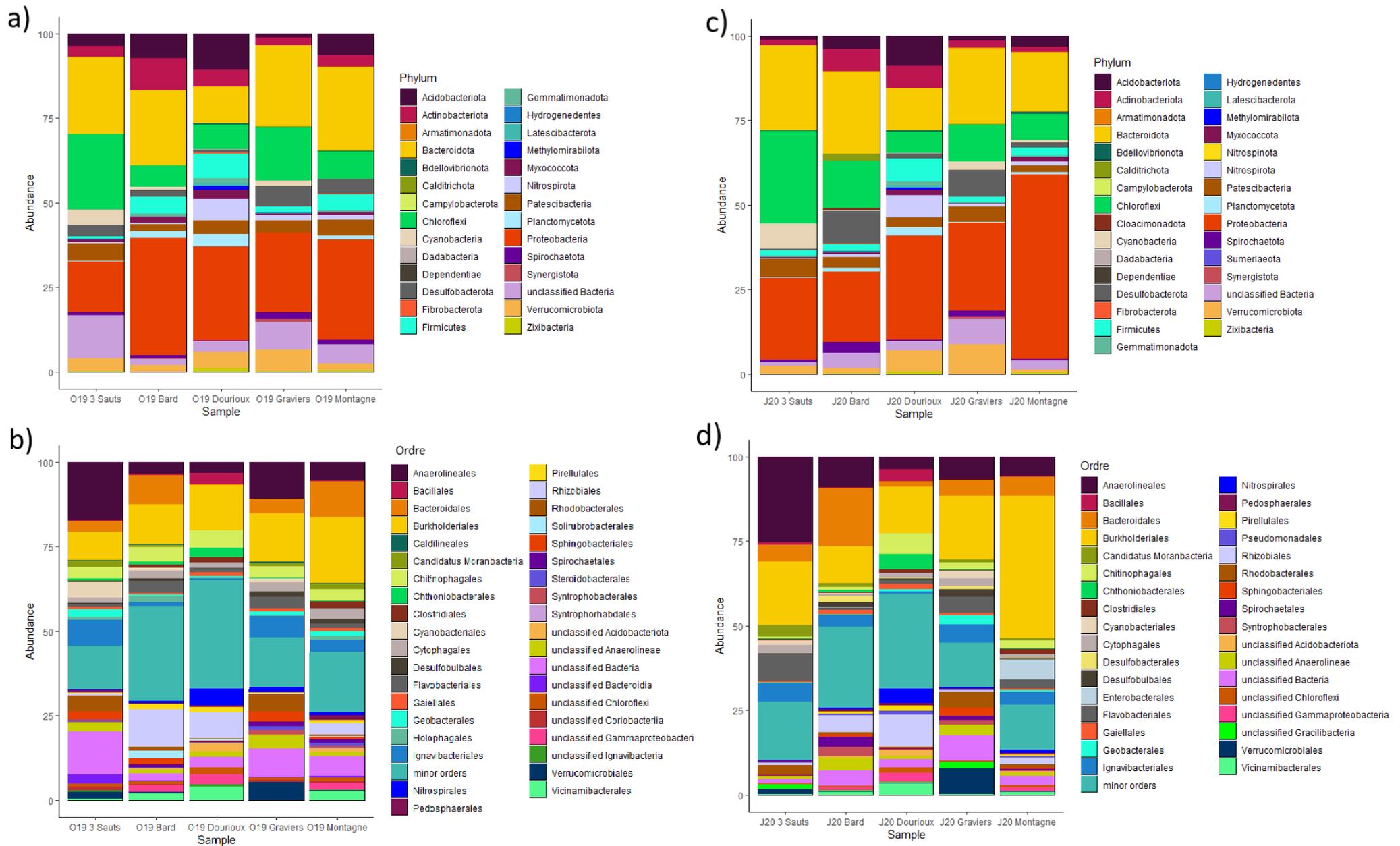


Figure 36: Abundance relative (exprimée en % du nombre total de lecture d'OTUs) des bactéries, a) des phylums; b) des ordres majeurs pour la campagne 2019 et c) des phylums d) des ordres majeurs, pour la campagne 2020. Ordres mineurs = ordre représentant <0,5% de la totalité des séquences obtenues pour chaque campagne

3) Relation entre les différents paramètres environnementaux et les communautés bactériennes dans les sédiments de sources minérales

Le deuxième objectif de cette étude était d'observer si ces communautés sont discriminées en fonction des paramètres physicochimiques de ces sources, afin de déterminer si la radioactivité pouvait expliquer la présence d'OTUs spécifiques, et si ces OTUs pouvaient jouer un rôle dans la biogéochimie de ces radioéléments. Pour répondre à cette question, il faut tout d'abord déterminer les OTUs qui ont le plus de poids pour discriminer les sources entre elles. Par la suite, il convient d'observer si la présence de ces OTUs spécifiques dans ces sources est corrélée aux paramètres physico-chimiques de celles-ci. Pour cette partie de l'étude, la source de 3 Sauts a été retirée de l'analyse pour la campagne de juin 2020, du fait de l'absence de certaines données physico-chimiques pour cette campagne.

a) Identification des OTUs discriminant ces sources

Afin de déterminer si le profil des communautés bactériennes de ces sources est différent selon des OTUs prédominantes dans celles-ci, un test statistique appelé Sparse Partial Least Square Discriminant Analysis (sPLS-DA) a été réalisé à partir des tables d'OTUs préfiltrées pour les échantillons de 2019 et 2020 (voir chapitre 2). Pour la campagne de 2019, l'analyse sPLS-DA se concentre sur la discrimination des cinq sources étudiées par des OTUs bactériennes spécifiques à ces sources.

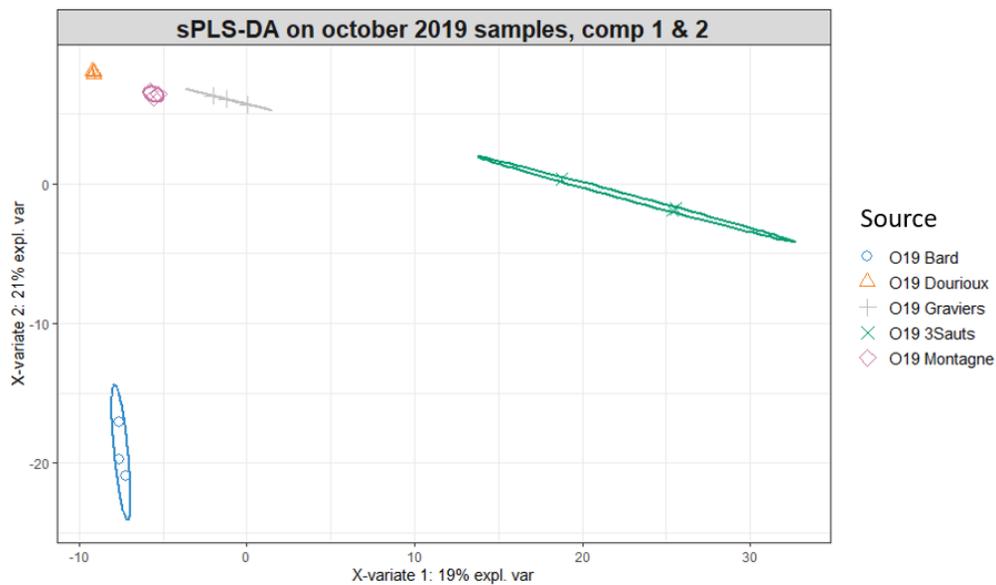


Figure 37: Répartition des échantillons des sources de la campagne de 2019 due aux OTUs prédominantes dans chacune d'entre elles, provenant de l'analyse sPLS-DA sur les deux premières composantes avec des tracés d'ellipses au niveau de confiance de 95%

D'après le plot de la sPLS-DA (Figure 37), les compositions bactériennes des sources de Bard et 3 Sauts sont significativement différentes des 3 autres sources, dû à certains OTUs prédominantes dans ces deux sources. Les sources de Dourieux, Montagne et Gravieres sont également significativement discriminées les unes par rapport aux autres, bien qu'elles soient proches entre elles dans l'espace, comparées aux sources de Bard et 3 Sauts. En effet, la première composante a permis de discriminer principalement la source de 3 Sauts, mais également les sources de Dourieux et Montagne. D'un autre côté, la source de Bard est majoritairement séparée des quatre autres sources par la deuxième composante. En complément, une analyse de clustering utilisant un heatmap basé sur les OTUs sélectionnées a permis de mettre en évidence les OTUs significativement présentes dans chacune des 5 sources étudiées (Figure 38).

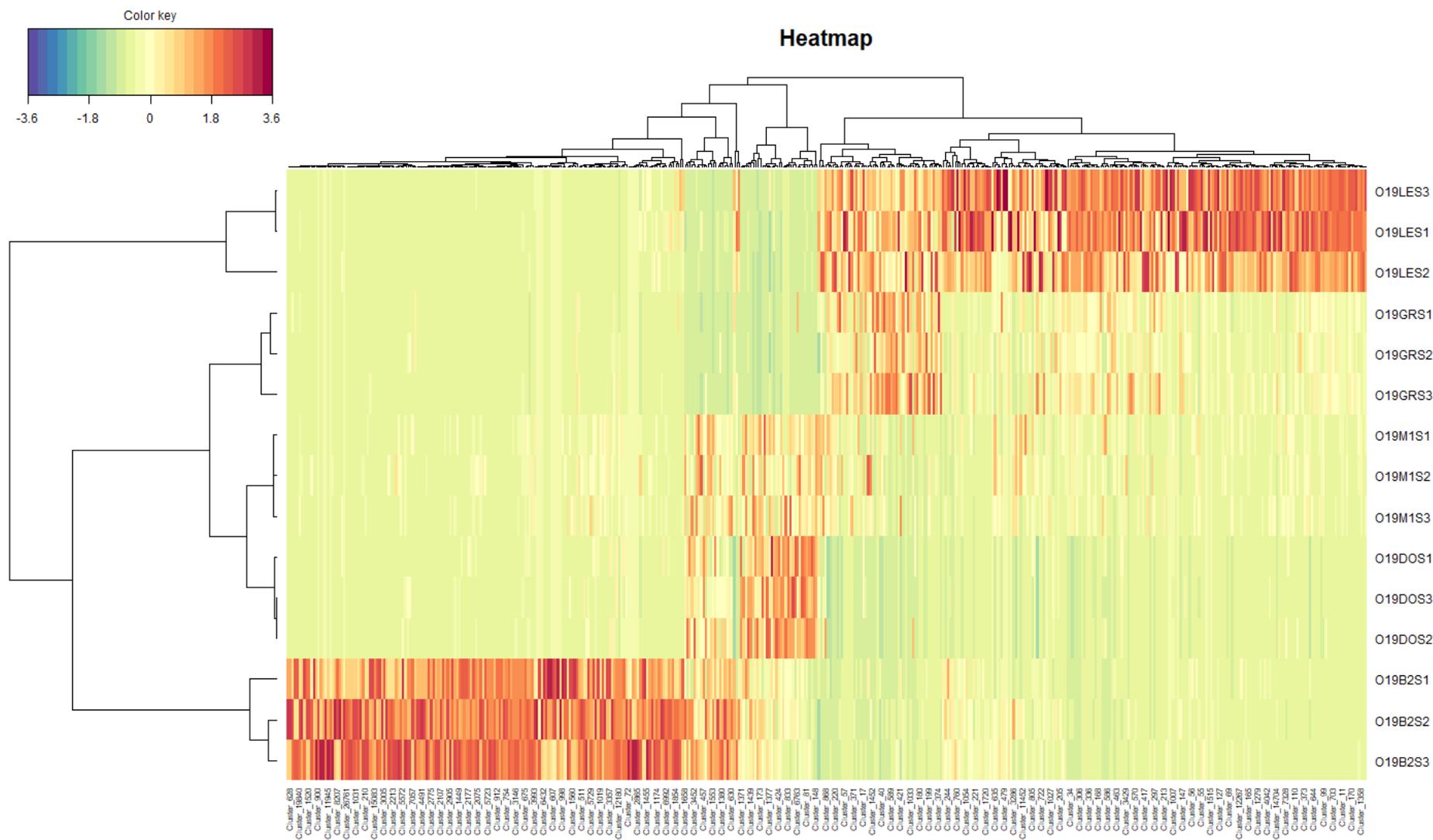


Figure 38: Carte d'images groupées (heatmap) représentant l'abondance relative des OTUs sélectionnées dans chaque échantillon par sPLS-DA sur les données pré-filtrées des OTUs à partir des deux premières composantes en octobre 2019

Pour cette campagne d'octobre 2019, l'abondance relative de 236 OTUs ont conduit à discriminer la source de 3 Sauts (Figure 38). Ces OTUs appartiennent majoritairement aux *Bacteroidota* (ordres *Bacteroidales*, *Chitinophagales*, *Ignavibacteriales* et *Sphingobacteriales*), *Chloroflexi* (principalement famille *Anaerolineaceae*) et *Proteobacteria* (principalement familles *Comamonadaceae*, *Gallionellaceae*, *Rhodobacteraceae*). D'autre part, les sources de Montagne et Dourieux sont séparées des autres sources par la présence de 54 OTUs. Ces OTUs sont majoritairement associées aux *Proteobacteria* (uniquement représenté par les ordres *Burkholderiales* et *Rhizobiales*), *Bacteroidota* (famille *Flavobacteriaceae* et *Chitinophagaceae*), *Acidobacteriota* (classe *Vicinamibacteria* et *Holophagae*) et *Firmicutes* (*Paenibacillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Pelosinus sp.*, *Desulfosporosinus sp.*, et *Fonticella sp.*). Enfin, la source de Bard est majoritairement discriminée des quatre autres sources par la présence de 170 OTUs prédominantes dans celle-ci. Parmi ces OTUs, la majorité est représentée par les *Proteobacteria* (ordres *Rhizobiales* et *Burkholderiales*). De plus ces OTUs sont également principalement affiliés à *Bacteroidota* (ordres *Bacteroidales*, *Chitinophagales* et *Cytophagales*) et *Actinobacteriota*, dont la classe des *Actinobacteria* (ordre *Frankiales*) et la classe *Thermolephilia* (ordre *Solirubrobacterales*).

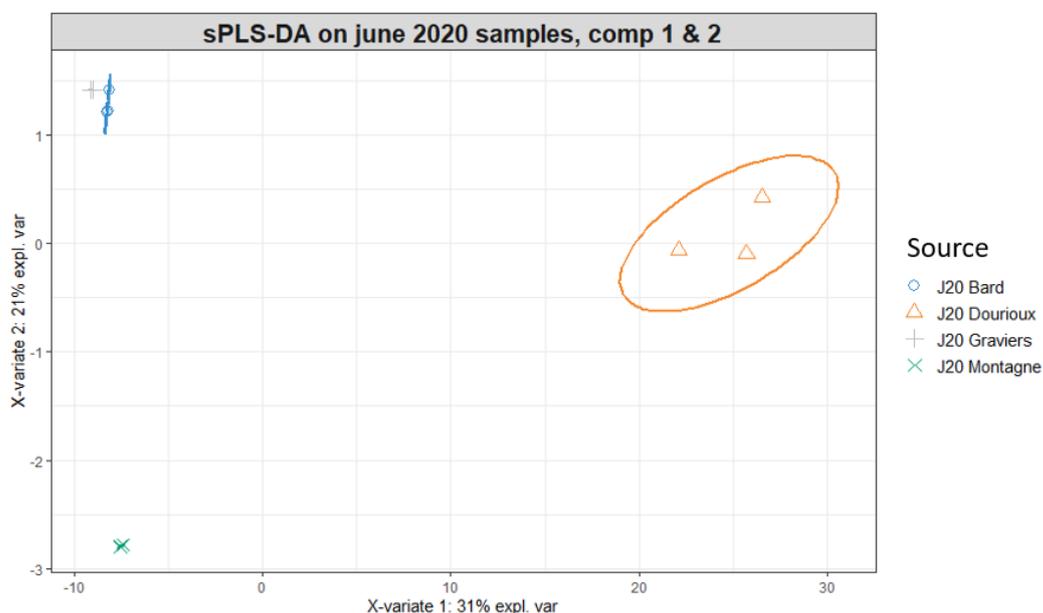


Figure 39: Répartition des échantillons des sources de la campagne de 2020 due aux OTUs prédominant dans chacune d'entre elles, provenant de l'analyse sPLS-DA sur les deux premières composantes avec des tracés d'ellipses au niveau de confiance de 95 %

Pour la campagne de juin 2020, l'analyse sPLS-DA a été conduite sur les quatre sources étudiées, afin de déterminer les OTUs spécifiques à chacune qui les discriminent entre elles pour cette campagne. Le plot de l'analyse sPLS-DA (Figure 39) montre que la composition bactérienne des sources de Dourieux et Montagne sont significativement différentes des 2 autres sources, dû à certains OTUs prédominantes dans ces sources en juin 2020. Au contraire, les sources de Bard et Graviers sont relativement proches, signifiant que peu d'OTUs spécifiques à ces sources conduisent à les discriminer l'une de l'autre. La première composante a permis de discriminer majoritairement la source de Dourieux, par rapport aux sources de Montagne, Bard et Graviers, alors que la deuxième composante, sépare la source de Montagne des 3 autres sources. Une analyse de clustering par heatmap (Figure 40) a également été réalisée sur les OTUs sélectionnées pour déterminer quelles sont les OTUs prédominantes dans chacune des sources.

Pour cette campagne de juin 2020, la source de Dourieux est discriminée par rapport aux sources de Montagne, Bard et Graviers, dû à 295 OTUs spécifiques à cette source. Parmi ces OTUs, 19 phylums sont représentés, avec majoritairement des *Proteobacteria* (ordres *Burkholderiales* et *Rhizobiales*), des *Bacteroidota* (ordres *Chitinophagales*, *Ignavibacteriales* et *Kryptoniales*), *Acidobacteriota* (classes *Vicinamibacteria*, *Blastocatellia*, *Holophagae*), des *Actinobacteriota* (*Streptomyces sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Gaiella sp.*, *Arthrobacter sp.*, et *Microbacteriaceae*), *Chloroflexi* (famille *Anaerolineaceae*), *Firmicutes* (*Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.*, *Sporosarcina sp.*, *Pelosinus sp.*) et *Nitrospirota* (*Nitrospira sp.*). Par la suite, la source de Montagne est majoritairement séparée des 3 autres sources par la présence de 5 OTUs prédominantes dans cette source (2 affiliées à *Bacteroidota* : 1 *Cytophagales* (ordre) et 1 *Sphingobacteriales* (ordre) ; 2 *Proteobacteria* : 1 *Rhizobiales* (ordre) et 1 *Gammaproteobacteria* (classe) ; 1 affiliée à *Chloroflexi*). Enfin, les sources de Graviers et Bard sont également séparées des 2 autres sources, dû à la présence de 5 OTUs spécifiques à ces sources (3 affiliées à *Bacteroidota* : 1 *Bacteroidales* (ordre), 1 *Ignavibacteriales* (ordre) et 1 *Kryptoniales* (ordre) ; 1 affiliée à *Chloroflexi* : famille *Anaerolineaceae*) ; 1 affiliée à *Proteobacteria* : *Methylotenera sp.*).

Ces résultats confirment que la structure de la composition des communautés bactériennes est significativement différente entre les échantillons de sédiments de sources étudiées lors des 2 campagnes d'échantillonnage (Figure 37 et Figure 39), dû à la présence d'OTUs spécifiques à chacune d'entre elles. La composition des communautés bactériennes est connue pour être spécifique aux niveaux de concentrations et/ou aux différentes conditions environnementales géologiques et physiologiques (Lopez-Fernandez et al., 2021). De plus, dans le cas de la source de Dourieux et Montagne, les radionucléides présents pourraient avoir entraîné une pression sélective sur les bactéries dans ces sources, qui fait évoluer les communautés bactériennes indigènes vers une composition dominée par des espèces résistantes (Martinez et al., 2006 ; Mondani et al., 2011 ; Jaswall et al 2019, Radeva et al 2013, Chandwadkar et al., 2018 ; Hoyos Hernandez., 2019 ; Rogiers et al., 2021). Cependant la radioactivité n'est qu'un des nombreux facteurs abiotiques pouvant influencer la structuration des communautés bactériennes. Il est également important de prendre en compte d'autres paramètres environnementaux de ces sources, qui pourraient avoir impacté les communautés bactériennes présentes dans celles-ci (Rogiers et al., 2021 ; Sitte et al., 2015). Ces différents paramètres environnementaux peuvent directement impacter les communautés bactériennes (présence de métaux toxiques, manque de nutriments, température ou pH différents) (Lauber et al., 2008), mais également jouer un rôle dans la spéciation de certains radioéléments (modification de pH, complexation avec la matière organique, oxyde de fer ou manganèse) impactant donc leur mobilité, leur biodisponibilité et donc leur toxicité sur les communautés bactériennes (Cumberland et al., 2016 ; Husson et al., 2019). Il semble donc important de discriminer les effets des différents paramètres, afin d'observer si la radioactivité dans ces sources pourrait expliquer la présence de certains OTUs spécifiques, et si ces OTUs pourraient jouer un rôle dans la biogéochimie de ces radioéléments.

b) Corrélation entre ces OTUs spécifiques et les paramètres physico-chimiques de ces sources

Dans le but d'observer si les OTUs spécifiques discriminant les sources entre elles sont corrélées aux paramètres physicochimiques de celles-ci, un test appelé Sparse Partial Least Squares (sPLS) a été réalisé (voir chapitre 2). Pour la campagne de 2019, 460 OTUs (OTUs prédominantes dans ces sources pour cette période), ont été intégrées avec 43 paramètres physicochimiques mesurés pour cette campagne, afin d'observer si la prévalence de certains

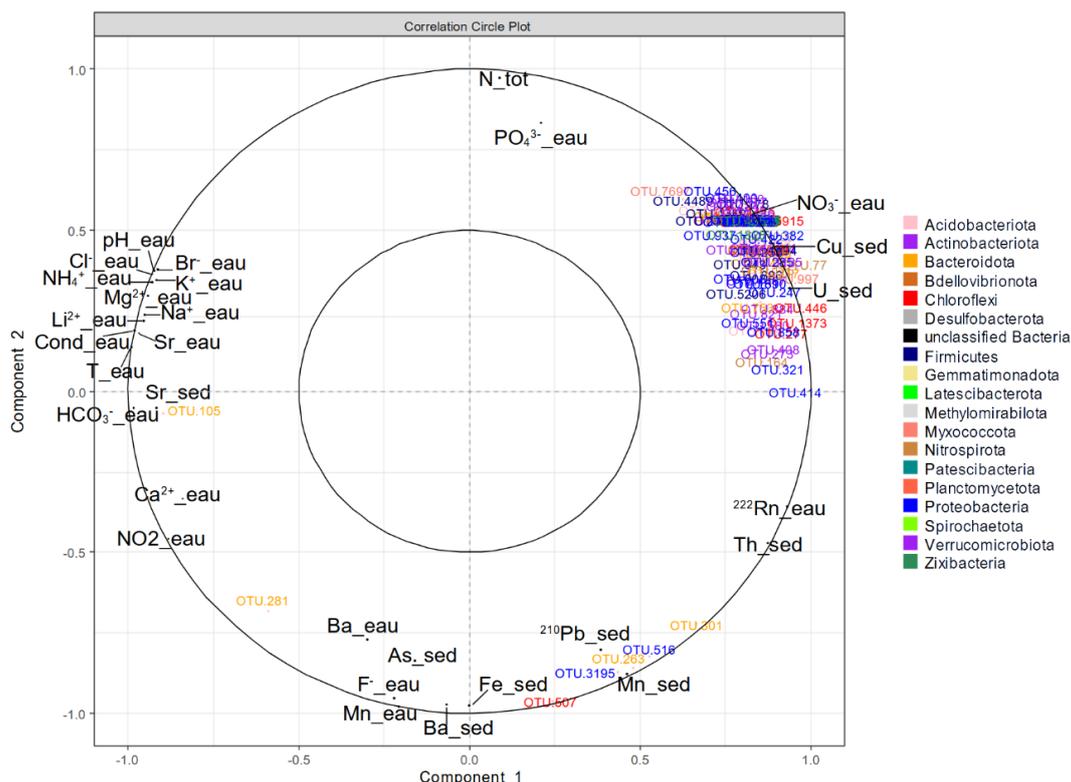


Figure 42: Cercle de corrélation de l'analyse sPLS mettant en évidence les relations entre les OTU spécifiques et les paramètres physico-chimiques des sources en juin 2020

D'un autre côté, une forte concentration en métaux (As, Fe, Sr), en éléments essentiels (SO_4^{2-} , Li^{2+}), un fort taux d'oxygène, ainsi qu'une faible concentration en Th et Pb sont corrélés à la présence de 165 OTUs spécifiques aux sources de 3Sauts et Gravieres. Ces OTUs sont principalement affiliées à *Acidobacteriota* (7 OTUs dont *Thermoanaerobaculia* et *Holophagae*); *Actinobacteriota* (9 OTUs dont *Solirubrobacterales*, *Gaiellales* et *Microtrichales*); *Bacteroidota* (28 OTUs dont *Bacteroidales*, *Chitinophagales*, *Flavobacteriales*, *Ignavibacteriales* et *Sphingobacteriales*); *Chloroflexi* (28 OTUs dont principalement *Anaerolineaceae*); *Patescibacteria* (23 OTUs dont *Gracilibacteria*, *Microgenomatia* et *Parcubacteria*); *Proteobacteria* (23 OTUs dont *Comamonadaceae*, *Gallionellaceae* et *Rhodobacteraceae*); et *Verrucomicrobiota* (15 OTUs dont principalement *Verrucomicrobiales*).

Enfin, 35 OTUs, spécifiques aux sources de Dourieux et Montagne, sont fortement associées à de fortes concentrations en radioéléments et métaux potentiellement toxiques (Pb, Th, ^{222}Rn), mais également à de fortes concentrations en nitrates et phosphates. Ces OTUs sont également corrélées à de faibles concentrations en ions majeurs (Mg^{2+} , K^+ , Br^- , Cl^- , HCO_3^- , Na^+ ,

Li²⁺), en Sr (eau + sédiment), ainsi qu'à une faible température et conductivité. Ces 35 OTUs sont affiliés à 10 phylums dont 5 OTUs à *Acidobacteriota* (*Vicinamibacterales*, *Holophagae*) ; 2 OTUs à *Actinobacteriota* (*Arthrobacter sp.*, *Streptomyces sp.*); 6 OTUs à *Bacteroidota* (*Flavobacterium*, *Chitinophagaceae*); 1 OTU à *Chloroflexi*; 7 OTUs à *Firmicutes* (*Paenibacillus*, *Bacillus*, *Pelosinus*, *Desulfosporosinus*, *Fonticella*); 1 OTU à *Nitrospirota* (*Nitrospira*); 4 OTUs à *Planctomycetota* (*Pirellulaceae*); 6 OTUs à *Proteobacteria* (*Nitrosomonadaceae*, *Methylophilaceae*, *Xanthobacteraceae*, *Rhodocyclaceae*); 1 OTU à *unclassified Bacteria* ; et 2 OTUs à *Verrucomicrobiota* (*Chthoniobacteraceae*).

Pour la campagne de 2020, les 305 OTUs spécifiques de cette campagne ont été intégrées avec 41 paramètres physicochimiques mesurés lors de cette campagne. Le modèle sPLS optimal a été construit sur deux composantes, avec au total 100 OTUs sélectionnés et 30 paramètres physico-chimiques, dont 50 OTUs et 20 paramètres pour la première composante, ainsi que 50 OTUs et 10 paramètres pour la deuxième composante. Il en résulte tout d'abord que 93 OTUs se regroupaient sur le cercle de corrélation (Figure 42). Ces OTUs, spécifiques principalement à la source de Dourieux, sont corrélées à de fortes concentrations en U, Cu, NO₃⁻, ²²²Rn et Th, N tot et PO₄³⁻ ainsi que principalement à de faibles concentrations en ions majeurs HCO₃⁻, Ca²⁺, Sr (eau + sédiment), Li²⁺, Na⁺, Mg²⁺, K⁺, Br⁻, Cl⁻, NH₄⁺, une faible température, une faible conductivité et un faible pH. Parmi ces OTUs, affiliées à 15 phylums différents, 10 OTUs appartiennent aux *Acidobacteriota* (ordre *Vicinamibacteria*, *Holophagae*) ; 12 OTUs à *Actinobacteriota* (*Streptomyces sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Gaiella sp.*, *Arthrobacter sp.*, and *Microbacteriaceae*); 10 OTUs à *Bacteroidota* (*Chitinophagaceae*, *Ignavibacteriaceae*, *Microscillaceae*); 1 OTU à *Bellovibrionota* (*Bacteriovoracaceae*) ; 8 OTUs à *Chloroflexi* (*Anaerolineaceae*) ; 1 OTU à *Desulfobacterota* (*Geobacteraceae*); 9 OTUs à *Firmicutes* (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina*, *Pelosinus*) ; 1 OTU à *Methylomirabilota* (*Rokubacteriales*) ; 2 OTU à *Myxococcota* ; 5 OTUs à *Nitrospirota* (*Nitrospira*) ; 4 OTUs à *Patescibacteria* ; 1 OTU à *Planctomycetota* (*Brocadiaceae*); 21 OTUs à *Proteobacteria* (*Burkholderiales* : *Nitrosomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Sideroxydans sp.* ; *Pseudomonadales* ; *Rhizobiales* : *Hyphomicrobium sp.*, *Pseudolabrys sp.*); 6 OTUs à *Verrucomicrobiota* (*Chthoniobacteraceae*, *Pedosphaeraceae*, *Opitutaceae*) ; et 2 OTUs à *Zixibacteria*.

D'un autre côté, 5 OTUs majoritairement présentes dans la source de Montagne (*Chryseolinea*, *Sphingobacteriales*, *Chloroflexi*, *unclassified Gammaproteobacteria* et

Xanthobacter) forment un deuxième cluster sur le cercle de corrélation (Figure 42). Ces OTUs sont associées à de fortes concentrations en ^{210}Pb , Mn (eau + sédiment), ^{222}Rn , Th, Ba (eau + sédiment), Fe, As, et F^- , mais également à de faibles concentrations en N tot, PO_4^{3-} , Sr (eau), Mg^{2+} , Na^+ , Li^{2+} , NH_4^+ , K^+ , Br^- , Cl^- , une faible température, une faible conductivité et un faible pH. Enfin l'OTU 281 et l'OTU 105 forment à eux seuls un cluster distinct. L'OTU 281, affiliée à l'ordre *Kryptoniales* (phylum *Bacteroidota*), est corrélée à de fortes concentrations en Ba (eau + sédiment), Fe, As, F^- , Mn (eau), NO_2^- , Ca^{2+} , HCO_3^- et Sr (sed), et anti corrélé à de fortes concentrations en U, Cu, NO_3^- , N tot, PO_4^{3-} . Enfin l'OTU 105 (famille *Bacteroidetes*), spécifique aux sources de Bard et Graviers, est associée à de fortes concentrations en ions majeurs (Ca^{2+} , NO_2^- , HCO_3^- , Mg^{2+} , Na^+ , Li^{2+} , NH_4^+ , K^+ , Br^- , Cl^-), une forte concentration en Sr (eau + sédiment), une température, un pH et une conductivité élevé. A contrario, elle est associée à de faibles concentrations en U, Cu, NO_3^- , ^{222}Rn et Th.

Ces analyses ont permis de déterminer que certains OTUs identifiés se sont révélées être corrélées à certains paramètres physicochimiques, dont la concentration en radioéléments dans ces sources. En effet, certains OTUs spécifiques appartenant aux *Actinobacteriota* (*Microbacteriaceae*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Gaiella* et *Rhodococcus*), *Acidobacteriota* (*Holophagae*), *Bacteroidetes* (*Chitinophagaceae*), *Chloroflexi* (*Anaerolineaceae*), *Desulfobacterota* (*Geobacteraceae*), *Proteobacteria* (*Pseudolabrys*, *Pseudomonadales*, *Burkholderiales*, *Comamonadaceae*) et aux *Firmicutes* (*Bacillus*, *Desulfosporosinus*, *Paenibacillus*, *Fonticella*, *Sporosarcina* et *Pelosinus*) et prédominantes dans les sources les plus radioactives (Montagne et Dourieux), ont été trouvées corrélées avec des concentrations élevées de radioéléments (principalement U, ^{222}Rn , Th), de métaux (Cu et Pb), de nitrates, ainsi qu'à de faibles concentrations en éléments majeurs (condition oligotrophique). Ces OTUs, ont un métabolisme particulier qui leur permet de résister à la toxicité de ces métaux/radioéléments et de se développer dans ces environnements extrêmes, comme cela a été montré dans différents autres écosystèmes (Brzoska et al., 2022 ; Carvajal et al., 2012 ; Chapon et al., 2012 ; Gallois et al., 2018 ; Goswami et al., 2017 ; Islam and Sar., 2016 ; Lusa et al., 2019 ; Mondani et al., 2011 ; Nayak et al., 2021 ; Tang et al., 2021 ; Theodorakopoulos et al., 2015 ; Sutcliffe et al., 2019 ; Sun et al., 2021 ; Yang et al., 2022). Par exemple, *Gaiella* et *Rhodococcus* ont démontré leur capacité à se développer dans des sédiments de rivières contaminées en métaux lourds (Yang et al., 2022), tout comme *Microbacteriaceae*, *Arthrobacter*, *Pseudomonadales*, *Burkholderiales*, et *Streptomyces* qui ont été observées dans des environnements à forts taux de

radiations ou concentrations en radioéléments élevées (Carvajal et al., 2012 ; Chapon et al., 2012 ; Islam and Sar., 2016 ; Lusa et al., 2019 ; Tang et al., 2021).

Ces OTU spécifiques capables de se développer dans ces sources riches en métaux et radioéléments, pourraient immobiliser ces éléments entraînant une réduction de leur disponibilité (Acharya, 2015 ; Kolhe et al., 2018 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008 ; Ryzhkov et al., 2007 ; Simonoff et al., 2007 ; Thorgersen et al., 2016). Les mécanismes impliqués dans cette immobilisation des métaux et radioéléments sont la réduction, l'absorption et l'accumulation par les cellules, la biosorption, la complexation avec des protéines, polysaccharides et les biomolécules microbiennes, et la biominéralisation (Fashola et al., 2016 ; Kolhe et al., 2018; Lloyd, 2003 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008). De ce fait, la biodisponibilité des différents éléments pourrait différer entre les différentes sources étudiées, en fonction des paramètres physicochimiques propres à chacune, mais aussi du microbiome des sédiments présents dans chacune d'entre elles. En effet, *Rhodococcus* étant capable d'éliminer les éléments traces métalliques (Goswami et al., 2017), tels que le Pb et le Cu, qui sont trouvés en fortes concentrations dans ces sources, pourrait réduire la biodisponibilité de ces métaux toxiques dans ces sources minérales. De même, des membres de *Microbacteriaceae*, *Arthrobacter*, *Pseudomonadales*, *Chitinophagaceae*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Pelosinus* et *Sporosarcina* pourraient également réduire la toxicité de l'uranium par différents processus, tel que :

- La précipitation de l'uranium sous une forme minérale stable et insoluble via une activité phosphatase constitutive (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonadales*) (Beazley et al., 2007 ; Choudary et Sar., 2011 ; Martinez et al., 2007 ; Reitz et al., 2014 ; Zhang et al., 2018)
- L'accumulation intracellulaire de l'uranium sous forme de précipité (*Bacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacteriaceae* (Suzuki et Banfield, 2004 ; Li et al., 2014 ; Theodorakopoulos et al., 2015))
- L'adsorption par complexation de l'uranium avec des groupes fonctionnels de la surface des cellules (*Streptomyces*, *Bacillus* (Li et al., 2014 ; Li et al., 2016)), des protéines de la couche S de surface (*Pelosinus* et *Sporosarcina* (Ryzhkov et al., 2007 ; Thorgersen et al., 2016)) et la couche de lipopolysaccharide (*Chitinophagaceae* (Brzoska et al., 2022))

Ces OTUs, corrélées aux fortes concentrations en métaux (Cu et Pb) et radioéléments (U et Th) dans les sources de Montagne et Dourieux, partagent donc des fonctions similaires liées à leur capacité d'interagir avec des métaux et radioéléments. Leur présence dans ces environnements est très intéressante car ces interactions avec ces éléments entraînant une réduction de leur solubilité et leur biodisponibilité permettrait à d'autres espèces bactériennes sensibles à ces métaux/radioéléments toxiques de se développer.

D'autre part, des OTUs affiliées à *Desulfosporosinus*, *Geobacteraceae*, *Comamonadaceae* et *Holophagae* présentes dans les sources de Montagne et Dourieux, sont des bactéries sulfato-réductrices et/ou ferro-réductrices. En effet, les sédiments de ces sources minérales carbogazeuses sont favorables à des conditions anoxiques permettant le développement de bactéries anaérobies tel que les bactéries sulfato-réductrices et ferro-réductrices. Ces dernières, utilisant les métaux pour respirer, ont été étudiées pour leur capacité à réduire des métaux lourds, dont l'U(VI) dans des sédiments contaminés (Cardenas et al., 2008 ; Gihring et al., 2011 ; Mondani et al., 2011 ; Nevin et al., 2003 ; Sitte et al., 2015 ; Sutcliffe et al., 2017 ; Suzuki et al., 2004). En particulier les OTUs affiliées à la classe des *Holophagae*, dont certaines espèces comme *Geothrix*, principalement présentes dans la source Dourieux, pourraient profiter des concentrations élevées de cuivre et d'uranium dans cette source, pour respirer (Mondani et al., 2011 ; Sutcliffe et al., 2019). Par conséquent, ces OTUs pourraient jouer un rôle important dans les réactions de réduction de l'uranium et d'autres métaux dans ces sources minérales, entraînant leur immobilisation (Lloyd, 2003).

Outre les espèces réductrices de métaux, des bactéries fermentaires, telles que *Anaerolineaceae*, associées aux fortes concentrations en uranium dans ces deux sources, sont également favorisées par les conditions anoxiques présentes dans ces sources. Compte tenu de la production potentielle d'acides organiques (tels que l'acétate) par les *Anaerolineaceae* (Jroundi et al., 2020) et de leur grande abondance dans les sédiments de ces sources, des relations syntrophiques peuvent avoir lieu entre ces bactéries fermentaires et les bactéries réductrices de métaux (Sutcliffe et al., 2017). En effet, l'acétate libéré par ces bactéries fermentaires pourrait être utilisé comme donneur d'électron et/ou source de carbone par les bactéries réductrices de métaux, ce qui soutiendrait leur croissance.

D'autre part, en plus des fortes concentrations en radionucléides et métaux, des concentrations élevées de nitrates ont été observées dans les sources de Montagne et Dourieux.

Ces composés favorisent la présence d'OTUs impliquées dans des processus de nitrification (*Nitrospira*, *Nitrosomonadaceae*) et dénitrification (*Hyphomicrobium*) importants dans le cycle de l'azote, (Martineau et al., 2013 ; Pester et al., 2014). Cependant, bien que les fonctions de nitrification puissent être affectées par une contamination en métaux et radioéléments (Rogiers et al., 2021; Sutcliffe et al., 2017), la présence de *Nitrospira* dans les deux sources confirme qu'elles peuvent se développer en présence de métaux toxiques (Xiao et al., 2019), et pourraient résister à de fortes concentrations de cuivre (Sutcliffe et al., 2019). En outre, il a été démontré que dans les aquifères co-contaminés par l'uranium et le nitrate, les dénitrifiants jouent un rôle clé dans la biorémediation de ces écosystèmes, sachant que les nitrates peuvent empêcher la réduction de l'U(VI) en entrant en compétition avec ce dernier en tant qu'accepteur d'électrons (Spain et Krumholz, 2010 ; Yan et al., 2003).

Ces co-corrélations entre des OTUs associées à des espèces ferro ou sulfato réductrices, des espèces fermentaires et des espèces dénitrifiantes, avec des fortes concentrations en métaux/radioéléments reflètent des associations de bactéries remplissant des fonctions complémentaires permettant leur croissance dans ces environnements particuliers. En effet, la bioréduction de l'uranium par les bactéries ferro/sulfato réductrices pourrait entraîner une diminution de la biodisponibilité et, par conséquent, de la toxicité de l'uranium, favorisant la croissance des bactéries fermentaires et dénitrifiantes. D'autre part, cette bioréduction serait favorisée à la fois par l'apport de sources de carbone organique par les bactéries fermentaires et la réduction de la concentration en nitrates par les bactéries dénitrifiantes. Enfin, l'apport de sources de carbone organiques par les bactéries fermentaires pour les bactéries dénitrifiantes favoriserait également la dénitrification, et donc la bioréduction de l'uranium. La Figure 43, ci-dessous résume ces associations complémentaires permettant à ces différentes bactéries de se développer dans ces sources, caractérisées par de fortes concentrations en radioéléments, dont l'uranium.

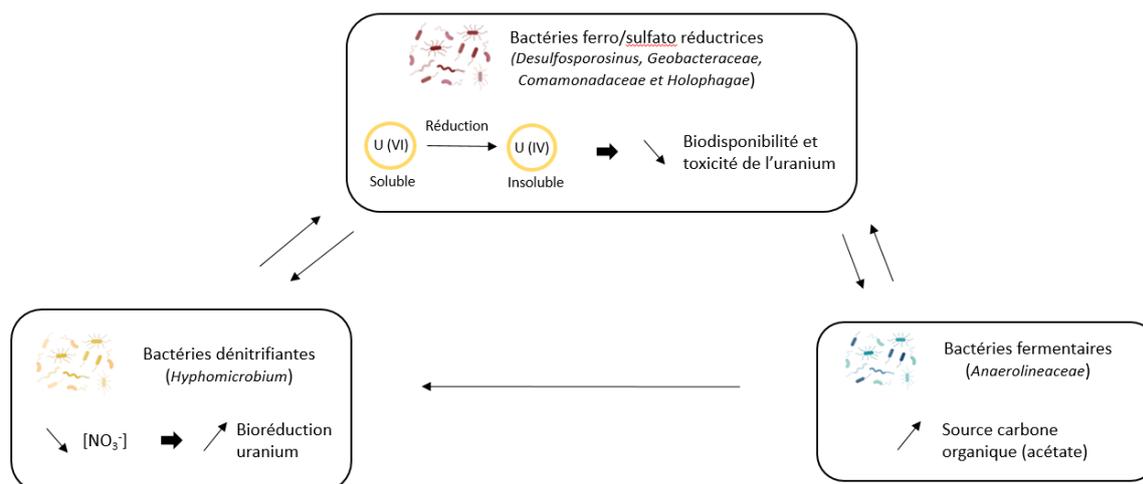


Figure 43 : Schéma représentant les associations complémentaires possibles entre les différents OTUs associées aux fortes concentrations en radioéléments, dont l'uranium, dans les sédiments des sources de Montagne et Dourieux. Les flèches représentent les relations commensales ou mutualistes entre ces différentes espèces

Il apparaît donc qu'il existe des interactions complexes entre les facteurs biotiques et abiotiques dans ces sources, entraînant une sélection de bactéries spécifiques dans chacune d'entre elles au cours des deux saisons étudiées. Toutefois, nos résultats démontrent que la présence de certaines OTUs n'est pas associée à un seul composé mais qu'il existe plutôt une somme de co-corrélations avec divers paramètres physicochimiques. Les microorganismes n'étant jamais confrontés à un seul contaminant sur le terrain, il est difficile de différencier les effets d'une seule espèce de métal sur les communautés microbiennes *in situ* (Sitte et al., 2015 ; Rogiers et al., 2021). Des études complémentaires pour déterminer la part (bio)disponible des radioéléments/métaux permettraient de mieux discriminer les effets de ces éléments sur les communautés bactériennes. Enfin, bien que les fonctions bactériennes déterminées dans ces sédiments de sources à partir des analyses par metabarcoding soient uniquement putatives, il semblerait que des schémas de cooccurrence révèlent des associations de bactéries remplissant des fonctions similaires ou complémentaires, et qui partagent des niches écologiques similaires. Des travaux futurs d'analyse par métagénomique des fonctions bactériennes globales permettraient d'étudier le métagénome de ces échantillons et décrire le fonctionnement global de ceux-ci.

4) Evolution des communautés au cours des saisons

La dernière partie de cette étude visait à déterminer si les communautés bactériennes évoluaient en fonction de la saison dans ces sources minérales. Tout d'abord, afin de visualiser si les communautés diffèrent en fonction des deux campagnes d'échantillonnage réalisées, un test de comparaison des moyennes (t-test) des indices de diversité obtenus pour chaque échantillonnage a été réalisé (Figure 44).

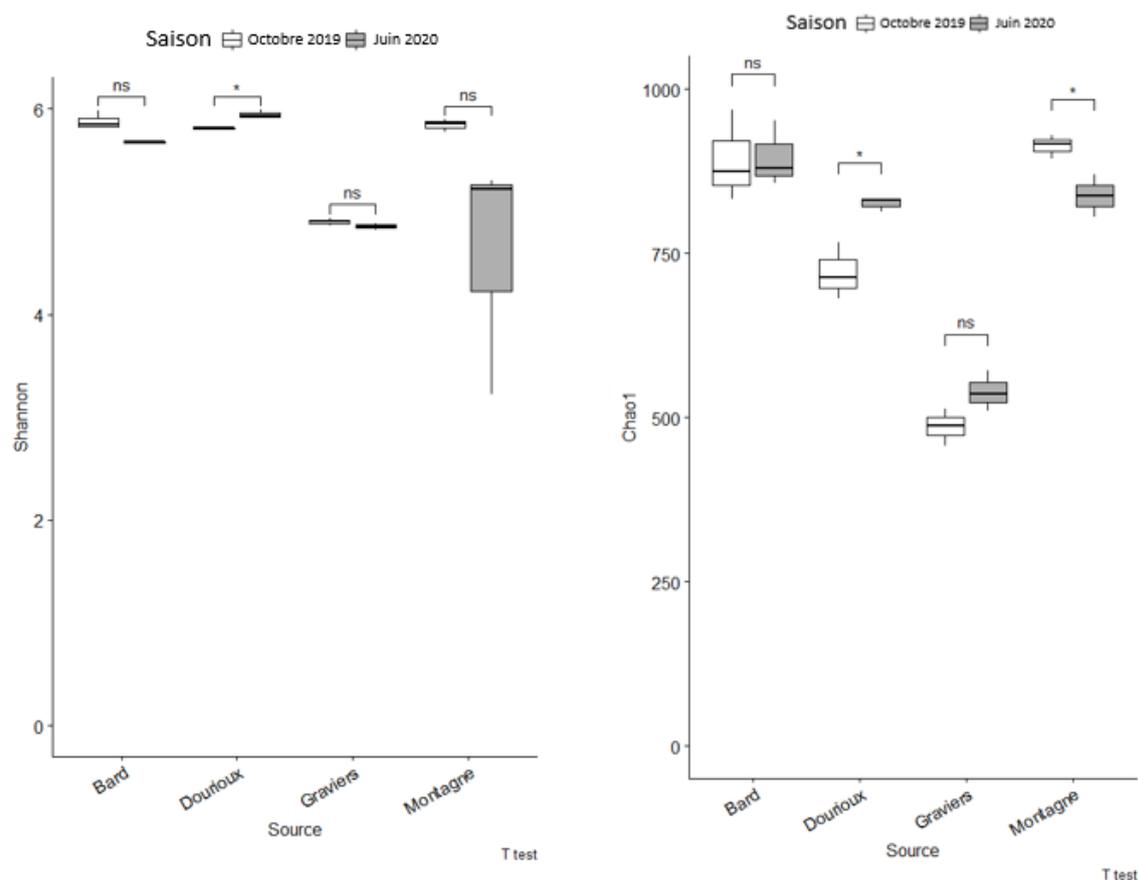


Figure 44: Comparaison des indices de diversité de Shannon et de Chao1 entre les deux saisons (octobre 2019 et juin 2020) pour chaque source visualisée en boxplots. Les différences significatives obtenues par une comparaison des moyennes par t-test entre les deux saisons sont indiquées par un * si $p < 0,05$.

Nos résultats montrent que la diversité alpha (diversité et richesse) des sources de Dourieux et de Montagne est significativement différente selon la période d'échantillonnage. En effet, pour la source de Dourieux, l'indice de diversité de Shannon mesuré en octobre 2019 ($5,71 \pm 0,01$) est significativement différent de celui mesuré en juin 2020 ($5,86 \pm 0,04$). Pour cette même source, l'indice de richesse Chao1 mesuré lors des deux campagnes est également significativement différent ($658,43 \pm 34,59$ et $732,06 \pm 16,68$ respectivement). Enfin, l'indice

de richesse Chao1 mesuré pour la source de Montagne est aussi significativement différent entre les deux campagnes d'échantillonnage ($877,26 \pm 26,04$ et $768,04 \pm 24,34$ respectivement).

Bien que ces sources minérales naturelles d'origine souterraines puissent être supposées stables dans le temps (Cornu et al., 2000, Négrel et al., 2000), l'étude des profils physico-chimiques de ces sources a montré que les paramètres physico-chimiques de certaines sources ont évolué entre les deux périodes d'échantillonnage (Figure 31). En particulier, des variations de paramètres physico-chimiques dues à des phénomènes de dilution entraînés par des eaux de ruissellement liées aux précipitations ont été observées dans les sources de Montagne et Dourieux. Etant donné que les communautés bactériennes sont liées à des niveaux de concentration et/ou aux différentes conditions environnementales géochimiques et physiologiques (Lopez-Fernandez et al., 2021 ; Radeva et al., 2013 ; Sowmya et al., 2020), ces variations des paramètres physico-chimiques peuvent expliquer les différences significatives de diversité alpha (diversité et richesse) mesurées dans les sources de Dourieux et Montagne entre les deux périodes d'échantillonnage (Figure 44).

Enfin, une analyse sPLS a été réalisée en utilisant la table des OTUs pré-filtrés (1469 OTUs) et les paramètres physico-chimiques (41) mesurés pour les 4 sources échantillonnées en octobre 2019 et juin 2020. L'objectif de cette analyse est d'observer si ces sources se séparent entre les deux périodes d'échantillonnage selon les OTUs présentes dans celles-ci, et les paramètres physico-chimiques mesurés dans chacune d'entre elles. La Figure 45 illustre la projection des échantillons dans l'espace défini par la moyenne des composantes associées aux deux jeux de données. Ces quatre sources sont significativement séparées selon la période d'échantillonnage par leurs profils physico-chimiques et les communautés bactériennes présentes dans chacune d'entre elles. Ceci suggère que la structure des communautés bactériennes évolue en fonction de la saison d'échantillonnage, en raison de l'évolution de certains paramètres physico-chimiques entre les saisons. Le cercle de corrélation (Figure 46) permet d'observer les variables qui sont responsables de la distribution spatiale des échantillons.

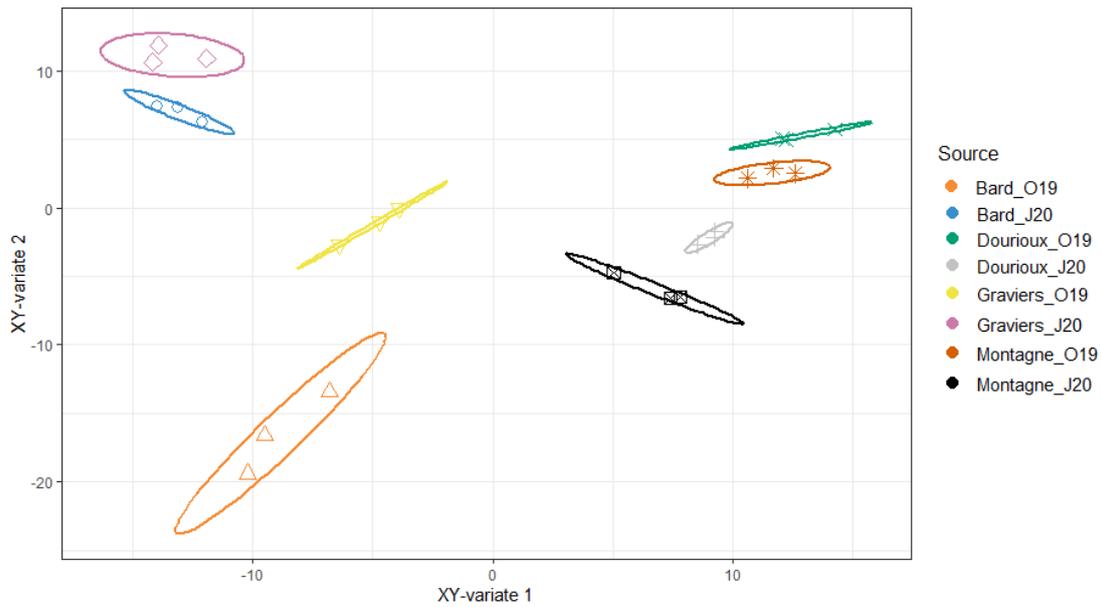


Figure 45: Projection des échantillons des sources, en Octobre 2019 et Juin 2020, dans l'espace défini par les composantes moyennes du jeu de données des OTUs et du jeu de données des paramètres physico-chimiques, avec des tracés d'ellipses au niveau de confiance de 95 %

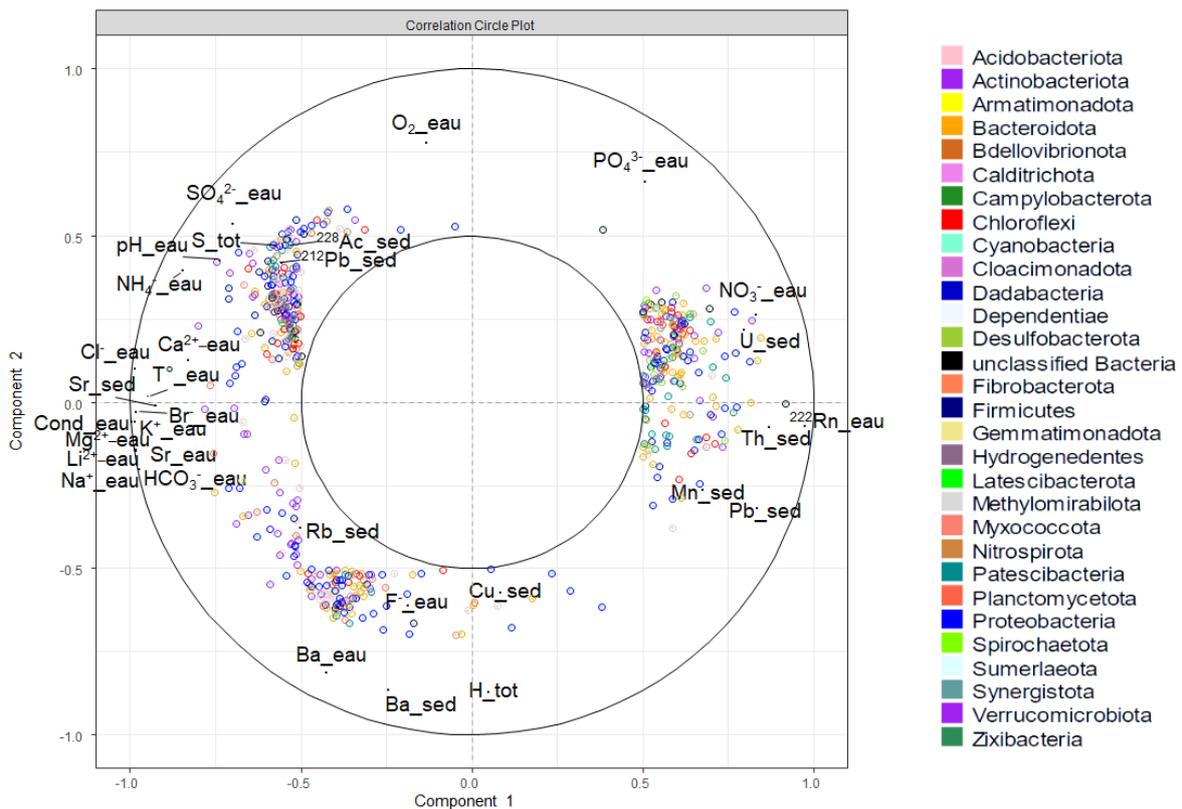


Figure 46: Graphique du cercle de corrélation de l'analyse sPLS mettant en évidence les OTUs et les paramètres physico-chimiques expliquant la répartition des échantillons des sources lors des deux saisons étudiées

D'après le cercle de corrélation (Figure 46), la distribution des échantillons des sources de Bard et Graviers (Figure 45) s'explique par la présence d'OTUs spécifiques à ces deux sources, qui sont corrélées à de fortes concentrations en ions majeurs (principalement HCO_3^- , Li^{2+} , Mg^{2+} , Br^- , Sr , Cl^- et la conductivité à gauche du cercle). En revanche, les sources de Montagne et Dourieux se discriminent des sources de Bard et Graviers (Figure 45) par la présence d'OTUs corrélées à de fortes concentrations en ^{222}Rn , Th, U et NO_3^- (à droite du cercle - Figure 46). Les paramètres qui discriminent ces sources concordent avec ceux obtenus par l'ACP réalisée pour observer la répartition des sources selon les paramètres physico-chimiques (Figure 31 : Bard et Graviers caractérisées par des concentrations en ions majeurs plus élevées ; Dourieux et Montagne caractérisées par des concentrations en ^{222}Rn , Th, U et NO_3^- plus élevées). Cependant, aucun des paramètres ne semble refléter un effet saisonnier, car aucun n'explique la distribution des échantillons de 2020 par rapport aux échantillons de 2019. Par conséquent, les paramètres physico-chimiques utilisés pour cette analyse permettent davantage de discriminer les sources entre-elles, que d'expliquer les différences observées dues à la saison. Une solution pour observer cet effet saisonnier serait de prélever plus d'échantillons d'une même source à chaque saison pour obtenir plus de statistiques afin de discriminer quels sont les paramètres qui expliquent l'évolution des communautés bactériennes en fonction de la saison. Ces sources contiennent des populations bactériennes installées résultant de la pression de sélection associée à différents paramètres physico-chimiques (ions majeurs, radioéléments, etc.) propres à chacune de ces sources. Néanmoins, nous pouvons supposer que des modifications en apport nutritifs peuvent avoir lieu dans ces sources selon les saisons (apport de feuilles, nitrates, phytoplancton, cyanobactéries), entraînant une évolution des populations bactériennes au sein de chaque source. Cette hypothèse s'appuie sur d'autres études où des modifications de communautés bactériennes au cours des saisons ont déjà été observées dans des systèmes aquatiques (estuaires, zones humides, lacs, réservoirs d'eau potable) (Ou-Yang et al., 2022 ; Shang et al., 2022 ; Xu et al., 2018 ; Zheng et al., 2022), dues à des modifications de paramètres physicochimiques (pH, température, salinité, oxygène dissous).

III- Conclusion

En résumé, cette étude visait à déterminer si les communautés bactériennes étaient influencées par les paramètres physicochimiques de sources minérales radioactives, dont en particulier les fortes activités et concentrations en radioéléments mesurées dans certaines d'entre-elles. En effet, ces sources minérales sont des environnements particuliers où les niveaux de radioactivité élevés pourraient conduire à une sélection de certaines populations bactériennes résistantes permettant la mise en place de populations tolérantes et, par conséquent, à une communauté bactérienne spécifique adaptée à ces conditions. Nos résultats indiquent que ces sources représentent des biotopes distincts et contiennent des populations bactériennes spécifiques à chacune, qui évoluent en fonction des saisons, liées aux paramètres physicochimiques propres à chacune d'entre-elles. En particulier, deux sources (Dourieux et Montagne), distinguées des autres sources par une forte activité/concentrations en radioéléments, sont caractérisées par des populations bien distinctes par rapport aux autres sources étudiées. Il est intéressant de noter que dans ces deux sources, des corrélations fortes entre des radioéléments (U, Th et ^{222}Rn) et des OTUs spécifiques à celles-ci ont été observées. Plusieurs de ces OTUs identifiées pourraient intervenir dans la biogéochimie des métaux et radionucléides présents dans ces sources et présenteraient des fonctions similaires leur permettant de réduire la solubilité de ces éléments et, par conséquent, leur biodisponibilité. De plus, la co-corrélation de bactéries ferro ou sulfato réductrices, capables de bioréduire l'uranium et réduire la toxicité de l'uranium, avec des bactéries fermentaires libérant des sources de carbone organique et des bactéries dénitrifiantes, favorisant la bioréduction de l'uranium, reflètent des associations de bactéries remplissant des fonctions complémentaires permettant leur croissance dans ces environnements particuliers. La forte complexité des communautés bactériennes identifiées dans ces différentes sources nécessite des recherches approfondies sur leurs différentes fonctions pour comprendre comment ces communautés évoluent dans ces environnements extrêmes.

Chapitre 4 : Etude des
communautés bactériennes
du sol d'une zone humide
contaminée en uranium

I- Contexte général et objectifs

Ce quatrième chapitre est axé sur l'étude des communautés bactériennes présentes dans un sol contaminé en uranium, dû à une ancienne activité minière dans la région de Rophin (Puy de Dôme, France). En effet, au cours de ces dernières décennies, les activités anthropiques liées à la demande d'énergie nucléaire ont conduit au développement de plus de 4000 mines d'uranium dans le monde (Abdelouas et al., 2006 ; Dang et al., 2018). Ces activités minières ont entraîné la production de milliards de mètres cubes de résidus miniers, qui abritent de multiples éléments toxiques comme des éléments traces métalliques et des radionucléides (dont notamment l'uranium, le radium et le thorium), provenant de l'exploitation et du traitement du minerai d'uranium (Bernhard et al., 1998). Par conséquent, les environnements avoisinant ces mines se trouvent exposés à un risque de contamination par de multiples éléments toxiques (Abdelouas et al., 2006). Même après la fin de l'exploitation minière, les résidus d'uranium auraient un impact important sur l'environnement et la biosphère environnantes pendant une longue période (Momčilović et al., 2012 ; Yan et Luo, 2015). Malgré les stratégies de traitement et d'assainissement des effluents, l'accumulation de radionucléides en aval sur les zones humides naturelles, les rivages, les sédiments des lacs ou des cours d'eau, a également été observée, amplifiant leur risque éco-toxicologique (Markich, 2002 ; Sitte et al., 2015 ; Stetten et al., 2018). En particulier, les zones humides, présentes à proximité des mines d'uranium, s'avèrent être des zones naturelles favorisant le piégeage de particules et de métaux (Martin et al., 2020). Différents processus peuvent entraîner une immobilisation à long terme de l'uranium dans les zones humides, dont la réduction chimique et/ou microbienne des ions U(VI) solubles en U(IV) insolubles (Kalin et al., 2005 ; Lovley et al., 1991), la précipitation minérale, la sorption sur la matière organique naturelle (Wan et al., 2011), l'échange d'ions ou la sorption sur les minéraux (Dong et al., 2012 ; Grybos et al., 2007) et l'accumulation dans les plantes (Knox et al., 2008). Par conséquent, l'identification et la compréhension des mécanismes de mobilisation, d'accumulation et de transferts des radionucléides ainsi que de leurs effets au sein des écosystèmes terrestres, est d'un intérêt majeur (Li et al., 2014).

Dans ce contexte, comme décrit dans le chapitre 2, le projet INSPECT (INteractions, Spéciation et Effets des radionuCléides (U, Th, Ra, Po) d'une zone humide anThropisée) a pour objectif d'identifier l'origine, la spéciation et les mécanismes de transfert de radioéléments au sein d'une zone humide située à l'aval de l'ancien site minier d'uranium de Rophin (site de la Zone Atelier Territoires Uranifères, CNRS-INEE), ainsi que leurs interactions avec les microorganismes et les réponses des plantes. Cette zone humide présente un fort intérêt car elle

est caractérisée par la présence d'un horizon de sol défini par de fortes concentrations en radionucléides, dont l'origine est le transport et l'accumulation de particules fines argileuses provenant du débordement des bassins de décantation associés aux anciennes activités minières. Cependant, de nombreuses questions subsistent concernant le mode de transport, le comportement migratoire et la biodisponibilité des radionucléides dans cette zone en aval de l'ancien site minier. En particulier, selon la spéciation et la part biodisponibles de ces radionucléides, les microorganismes du sol de cette zone humide peuvent interagir directement ou indirectement avec ces éléments et/ou leur environnement, et participer aux processus de transfert et migration de ces éléments (Li et al., 2020; Wang et al., 2020). De plus, selon leur biodisponibilité et leur toxicité, les radionucléides et les éléments traces métalliques pourraient affecter les fonctions des communautés microbiennes et donc influencer les fonctions écologiques des zones humides (Singh et al., 2019 ; Guo et al., 2019). En effet, bien que les microorganismes puissent influencer le comportement des radionucléides, des études de métagénomique ont montré qu'il y a, en retour, une adaptation et une survie de certaines populations bactériennes dans ces sites contaminés en radionucléides (Lusa et al., 2019 ; Mondani et al., 2011 ; Mumtaz et al., 2018 ; Sitte et al., 2015, Theodorakopoulos et al., 2017). Par conséquent, il apparaît intéressant d'intégrer la part « biologique » aux analyses « chimiques » pour mieux comprendre la spéciation et les mécanismes de transferts des radionucléides dans cette zone humide.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail au sein du projet était : (1) de caractériser les communautés bactériennes d'une carotte de sol prélevée dans la zone humide en aval de la mine ; (2) et de mettre en évidence s'il existe des populations bactériennes tolérantes et/ou résistantes qui sont spécifiques à la zone blanchâtre (caractérisée par de fortes concentrations en radioéléments dont l'uranium) pouvant intervenir dans les processus de spéciation et de mobilité de l'uranium. Ces travaux permettront d'étudier l'influence de la radioactivité renforcée par des activités humaines (TENORM) sur les communautés bactériennes depuis quelques décennies, contrairement aux sources minérales (NORM) où les populations bactériennes ont été exposées à une radioactivité naturelle pendant des milliers d'années. Pour répondre à ces objectifs, trois profils de sols différents (couche de surface riche en matière organique (MO), zone intermédiaire blanche impactée par les activités minières (ZB), et couche profonde humifère (MH)) ont été échantillonnés le long d'une carotte de sol en surface (premiers 50 cm de sol), située dans la zone humide. Elle a été prélevée en condition anaérobie, en septembre 2020 (Figure 16– Chapitre 2).

II- Discrimination des communautés bactériennes édaphiques d'une zone humide contaminée en uranium

Les populations bactériennes des échantillons de sol de la carotte ont été analysées par séquençage en métabarcoding. Pour cela, l'ADN total des échantillons prélevés en triplicata dans chaque profil de sol (MO, ZB et MH), a été extrait, puis amplifié par PCR, en ciblant le gène de l'ARNr 16S. Les produits de PCR ont été purifiés puis séquencés par séquençage haut débit (Illumina Miseq) à la plateforme Get-Plage à l'INRAE de Toulouse (Voir chapitre 2). Au total, 88 447 séquences pour 2123 OTUs ont été obtenues pour les échantillons de sol de la carotte prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin.

1) Analyse de la composition et diversité des communautés bactériennes des différents profils de sols échantillonnés

a) Pré-filtrage de la table d'OTUs

Comme cela a été effectué pour la table d'OTUs des échantillons de sédiments des sources minérales radioactives, cette table d'OTU a aussi été pré-filtrée afin d'obtenir une table plus représentative. Les OTUs dont la proportion sur l'ensemble des échantillons était inférieure ou égale à 0,01% de la totalité des OTUs, ont été supprimées. Au final, 1 793 OTUs ont été conservées pour les 3 profils de sol de la carotte prélevée dans la zone humide. La conformité de la table d'OTUs obtenue a été vérifiée par analyse des courbes de raréfaction pour chaque échantillon. Pour chaque échantillon, les courbes de raréfaction ont atteint un plateau signifiant que le nombre de séquences conservées a permis de conserver l'ensemble des taxons présents dans les différents échantillons, permettant donc d'avoir une bonne vision de la diversité globale des communautés étudiées (Figure 47).

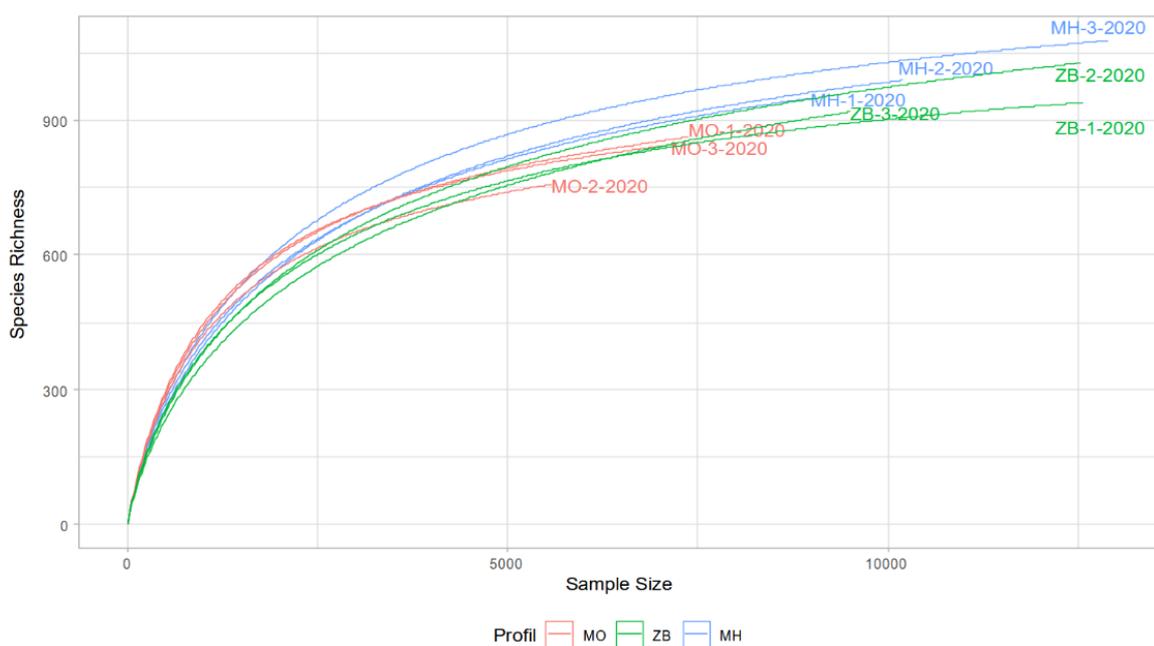


Figure 47: Courbe de raréfaction des OTUs bactériennes préfiltrées des échantillons de la carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de la mine de Rophin

b) Mesure des indices de diversité alpha

La diversité alpha dans les différents profils de sol échantillonnés a été quantifiée à l'aide de deux indices de diversité: l'indice de Chao1 (richesse spécifique) et l'indice de Shannon (diversité bactérienne). Les valeurs obtenues sont résumées dans le Tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11 : Nombre d'OTUs observées, ainsi que les indices de diversité alpha mesurés (Chao1 = richesse et Shannon = diversité), dans les échantillons de sol des différentes couches de la carotte de Rophin. Pour les indices de diversité, les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type ($n=3$)

Horizon	OTUs observées	Chao1 (Richesse)	Shannon (Diversité)
Couche MO	822 \pm 46	961,06 \pm 58,36	6,08 \pm 0,06
Couche ZB	961 \pm 47	1150,91 \pm 73,64	5,66 \pm 0,15
Couche MH	1005 \pm 54	1144,23 \pm 31,58	5,96 \pm 0,10

Les résultats du test ANOVA démontrent que les indices de diversité alpha mesurés (Shannon et Chao1) sont significativement différents entre ces 3 profils de sol échantillonnés au risque α de 5% ($p = 0,021$ pour la comparaison des moyennes de l'indice de diversité de Shannon ; $p = 0,026$ pour la comparaison des moyennes de l'indice de Chao1). La diversité bactérienne et la richesse spécifique évoluent le long de la carotte de sol. De plus, les tests post hoc effectués ont permis de déterminer que la diversité bactérienne est significativement plus faible dans la couche ZB que dans la couche MO. D'autre part, la richesse bactérienne est significativement plus élevée dans les couches ZB et MH que dans la couche MO (Figure 48).

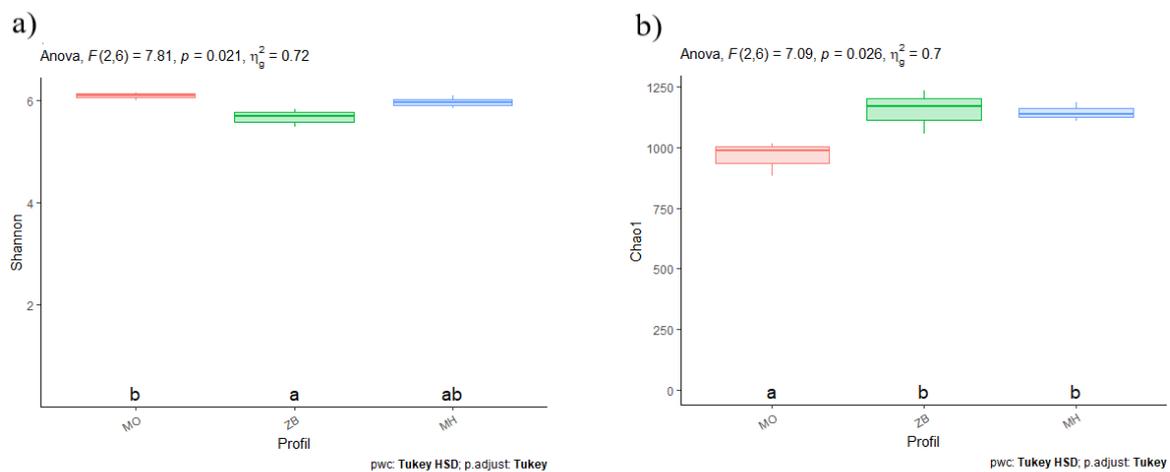


Figure 48: Comparaison des indices de diversité : a) de Shannon; b) de Chao1; entre les 3 profils de sols échantillonnés dans la carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier d'uranium de Rophin par une ANOVA ($n=3$). Les profils ayant des lettres différentes sont significativement différents à p value $< 0,05$ (test post hoc de Tukey)

Cette diminution de la diversité bactérienne dans la zone blanchâtre pourrait s'expliquer par la présence de fortes concentrations en uranium d'origine anthropique dans cette couche de sol, entraînant une diminution de l'abondance d'espèces dominantes, ce qui expliquerait une diversité plus faible par rapport à la couche MO (Rogiers et al., 2021). Cependant, les espèces bactériennes qui résistent à ces conditions extrêmes ont pu se développer entraînant une augmentation du nombre d'espèces dans la couche ZB, due à la diminution des phénomènes d'interactions (compétition, prédation) entre les différentes espèces de bactéries. Cette augmentation d'espèces rares se traduit par une richesse plus élevée observée dans cette couche. Bien que ces espèces rares soient peu représentées, elles peuvent avoir un rôle particulier ou important dans cette couche de sol, comme la libération de substrats qui permettrait à d'autres espèces de se développer. Cependant, nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence

significative de la diversité et richesse bactérienne entre la couche impactée par l'activité minière (ZB), et le paléosol (couche MH). Une hypothèse avancée serait que la couche MH présenterait une augmentation d'espèces bactériennes aux métabolismes variés, en particulier anaérobies, ce qui se traduirait par une augmentation du nombre d'espèces rares dans cette couche également.

c) *Composition taxonomique des populations bactériennes des profils de sol échantillonnés*

L'analyse de la composition taxonomique des échantillons de sols de la carotte de la zone humide a révélé la présence de 27 phylums et de 43 ordres majeurs. Les ordres majeurs sont définis comme étant les ordres ayant une abondance relative supérieure à 0,5%. Par conséquent, tous les ordres ayant une abondance relative inférieure à 0,5% ont été regroupés sous l'appellation « minor orders ». La Figure 49 et la Figure 50 représentent respectivement l'abondance relative de chaque phylum et ordre majeur dans les 3 couches de sols étudiées.

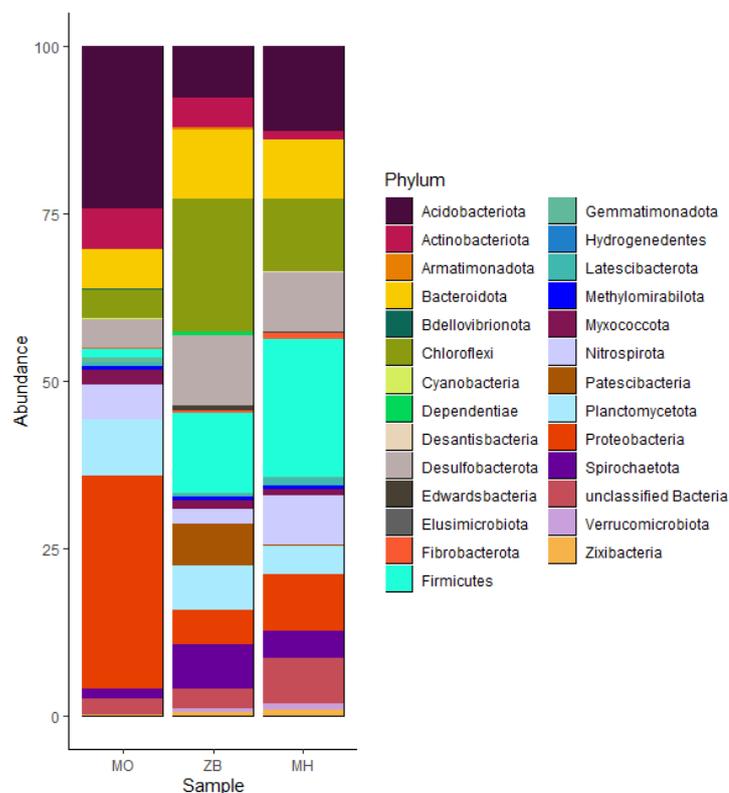


Figure 49 : Histogramme de l'abondance relative (exprimée en % du nombre total de lecture d'OTUs) de chaque phylum obtenu dans les 3 profils de sols échantillonnés en 2020

Les phylums des *Acidobacteriota*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* ont été majoritairement identifiés dans la carotte prélevée dans la zone humide à l’aval de l’ancienne mine (abondance relative supérieure à 10% parmi la totalité des OTUs obtenues dans cette carotte). Ces phylums sont couramment observés dans des sols (Janssen, 2006), mais également dans des sols d’anciens sites miniers d’uranium contaminés en radioéléments et métaux (Bondici et al., 2013 ; Dhal et Sar, 2014 ; Jaswal et al., 2019 ; Mumtaz et al., 2018 ; Radeva et al., 2013 ; Rastogi et al., 2009 ; Sitte et al., 2015 ; Yan et Luo, 2015). En outre, les phylums des *Bacteroidota*, *Desulfobacterota* et *Planctomycetota* sont également bien représentés dans la carotte de sol prélevée à l’aval de l’ancien site minier de Rophin (abondance relative entre 5 et 10% du total dans la carotte).

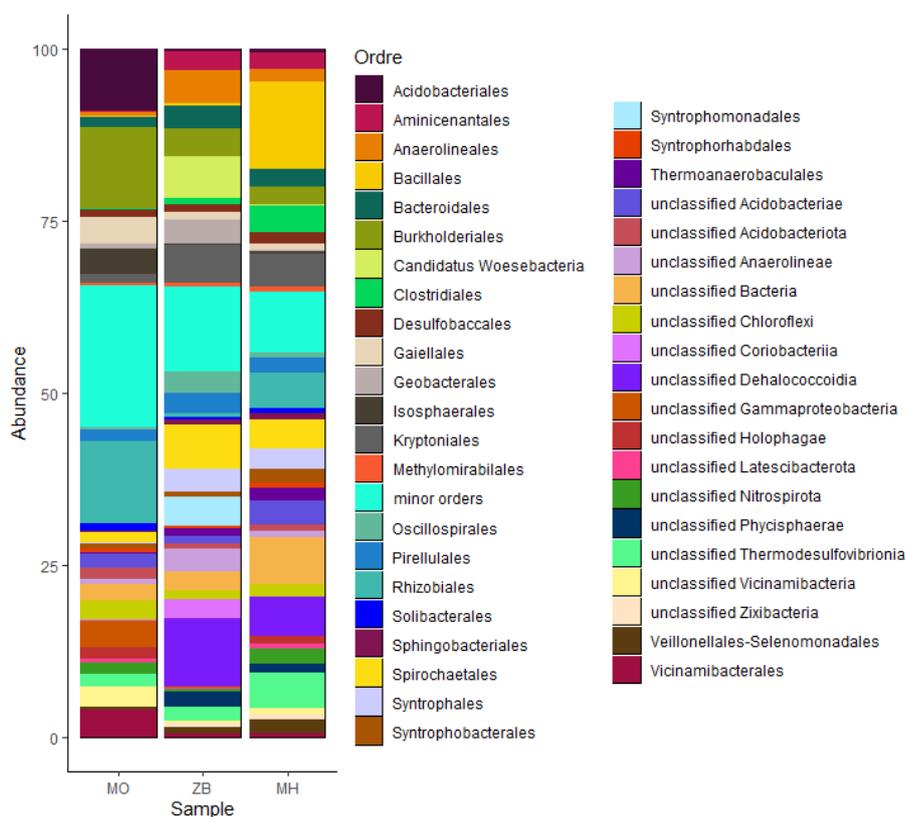


Figure 50 : Histogramme de l’abondance relative (exprimée en % du nombre total de lecture d’OTUs) des ordres majeurs obtenus dans les 3 profils de sols échantillonnés en 2020. Ordre mineur = ordre représentant <0,5% de la totalité des séquences obtenues dans la carotte

Il apparaît que la composition taxonomique diffère entre les différents profils géologiques échantillonnés. En effet, la couche de surface de matière organique (MO) est dominée par les phylums *Acidobacteriota*, avec les ordres des *Acidobacteriales* et *Vicinamibacterales*, et des *Proteobacteria*, avec les ordres *Burkholderiales* et *Rhizobiales*. D'autre part, les couches ZB et MH sont prédominées par les phylums *Acidobacteriota* (ordre *Aminicenantales*), *Bacteroidota* (ordres *Kryptoniales*, *Bacteroidales* et *Sphingobacteriales*), *Chloroflexi* (ordres *Anaerolineales* et *unclassified Dehalococcidia*), *Proteobacteria* (ordres *Rhizobiales* et *Burkholderiales*), *Desulfobacterota* (ordres *Syntrophales*, *Desulfobaccales* et *Geobacterales*) et *Firmicutes* (ordres *Bacillales*, *Clostridiales*, *Oscillospirales* et *Syntrophomonadales*). Bien que le phylum des *Firmicutes* soit prédominant dans les couches ZB (12,01%) et MH (20,60%), des différences de la composition taxonomique sont observées au niveau de l'ordre dans ces deux couches. Dans la couche ZB, le phylum des *Firmicutes* est dominé par des bactéries appartenant à l'ordre des *Oscillospirales* (3,05%) et *Syntrophomonadales* (4,17%) alors que dans la couche MH, le phylum des *Firmicutes* est dominé par des bactéries appartenant à l'ordre des *Bacillales* (12,71%) et *Clostridiales* (3,83%). Enfin, les phylums des *Nitrospirota*, *Spirochaetota*, *Actinobacteriota*, *Patescibacteria* et *Myxococcota* ont été détectés dans les 3 profils de sol avec des abondances relatives moyennes supérieures à 1%, mais n'excédant pas 5%.

Par conséquent, cette analyse de la composition bactérienne des différentes couches de sol montre une évolution de cette composition le long de la carotte de sol échantillonnée. En particulier, la composition taxonomique des couches ZB et MH diffèrent par rapport à la couche MO. Ces couches de sols sont définies par des paramètres physicochimiques spécifiques à chacune dont en particulier la couche ZB qui est caractérisée par de fortes concentrations en uranium, mais également par une faible quantité de carbone organique (Tableau 7) par rapport aux autres couches. Cette modification de la composition bactérienne le long de la carotte de sol pourrait donc être due aux différents paramètres physicochimiques définissant chaque couche de sol (toxicité des métaux/radioéléments, pH, disponibilité des nutriments, oxygène, etc.). De ce fait, l'objectif de la deuxième partie de cette étude est de déterminer si des populations spécifiques sont identifiées dans ces différentes couches, et si la concentration en uranium observée dans la couche ZB, par rapport aux autres paramètres physicochimiques, est un driver de la composition bactérienne. Notre hypothèse était que cette contamination due aux anciennes activités minières a entraîné une sélection de bactéries spécifiques au niveau de la

zone blanchâtre contaminée en uranium, capables d'interagir directement ou indirectement sur la spéciation et la mobilité des métaux/radionucléides.

2) Effets des paramètres physico-chimiques sur les communautés bactériennes

a) Identification des OTUs discriminant ces couches de sol

Une analyse sPLS-DA a été réalisée à partir de la table d'OTUs préfiltrée, afin de déterminer si les communautés bactériennes de ces 3 couches de sols sont différenciées par la présence de certaines OTUs spécifiques à chaque couche. Pour cette analyse, le modèle sPLS-DA optimal obtenu a été construit sur 2 composantes principales et 36 OTUs sélectionnées au total. D'après le plot de la sPLS-DA obtenu (Figure 51), les compositions bactériennes des 3 couches de sol sont significativement différentes, par la présence d'OTUs spécifiques à chaque couche. La première composante a permis de discriminer principalement la couche MO des couches ZB et MH, alors que la deuxième composante sépare les couches ZB et MH. En complément, une analyse de clustering par heatmap a également été réalisée sur les OTUs sélectionnées pour ces échantillons de sols afin de mettre en évidence les OTUs significativement présentes dans chacune des couches de sol (Figure 52).

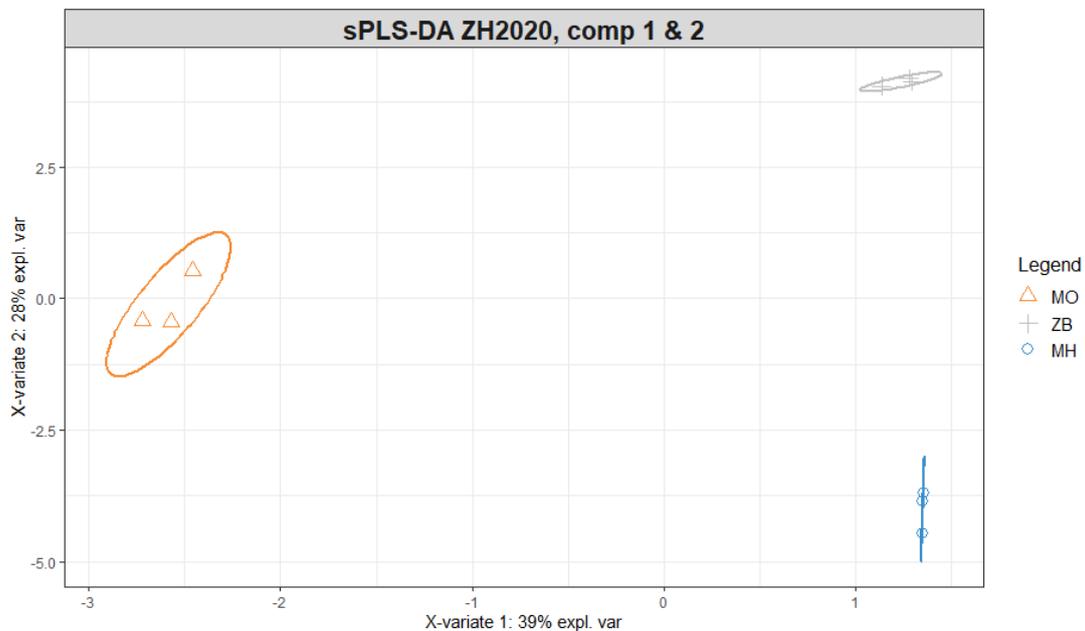


Figure 51: Répartition des échantillons des 3 profils de sol de la carotte de 2020, due aux OTUs prédominantes dans chacune d'entre elles, provenant de l'analyse sPLS-DA sur les deux premières composantes avec des tracés d'ellipses au niveau de confiance de 95%

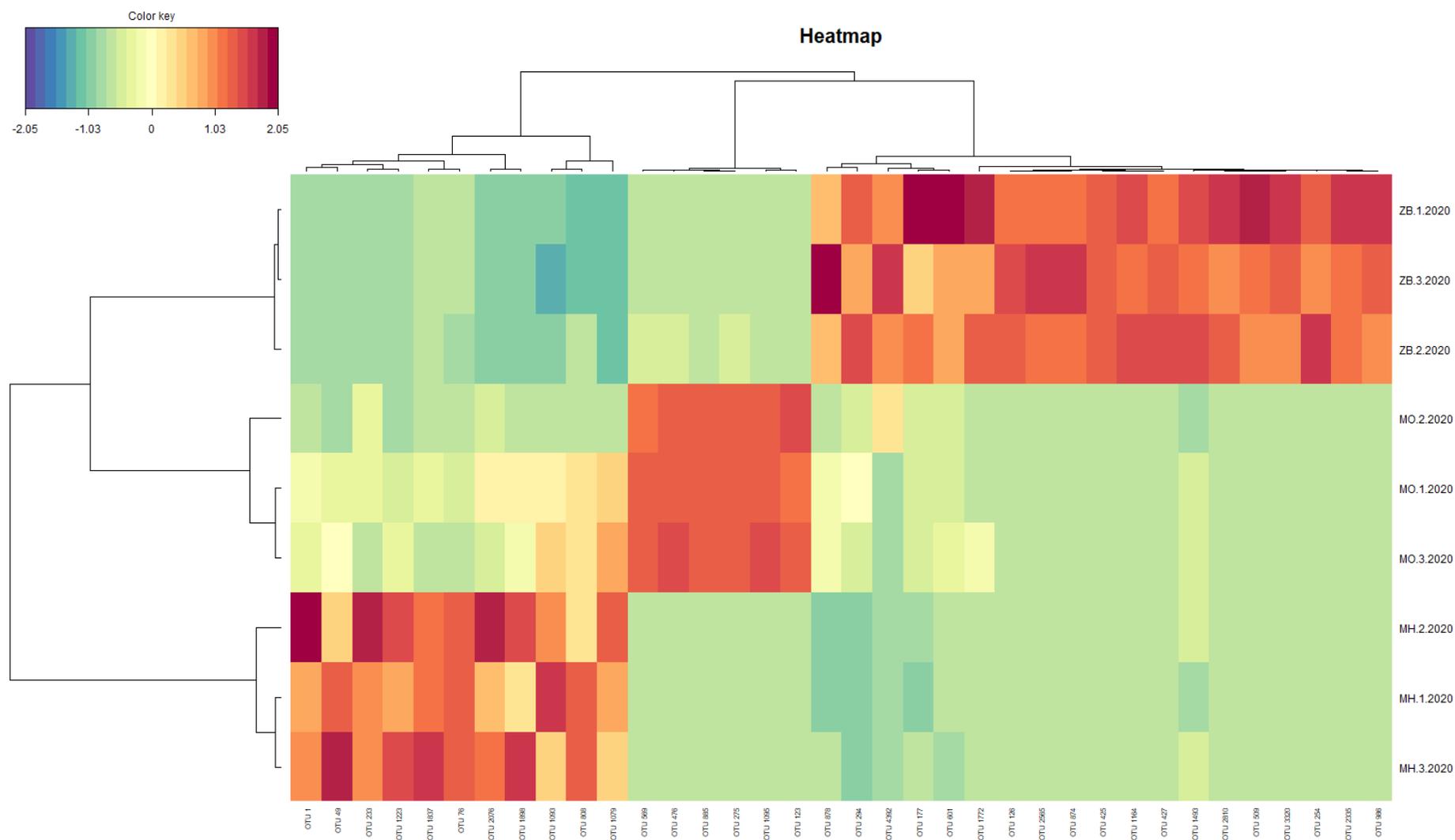


Figure 52 : Carte d'images groupées (heatmap) représentant l'abondance relative des OTUs sélectionnées dans chaque échantillon par sPLS-DA sur les données pré-filtrées des OTUs à partir des deux premières composantes pour les échantillons de sol de la carotte de Rophin

La couche MO est discriminée des couches ZB et MH, par la présence de 6 OTUs spécifiques à cette source (Figure 52). D'autre part, la couche ZB est majoritairement séparée des 2 autres couches par la présence de 19 OTUs prédominantes dans cet horizon du sol impacté par les activités minières antérieures en amont de la zone humide (Figure 52). Enfin, la couche MH est discriminée des autres horizons de sol par la présence de 11 OTUs spécifiques à cette couche (Figure 52). Ces différents OTUs spécifiques à chacune de ces couches de sol sont résumées dans le Tableau 12, ci-dessous.

Tableau 12 : OTUs spécifiques pour chaque couche de sol et leur affiliation obtenues à partir de l'analyse sPLS-DA

	OTU spécifique	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre
Couche MO	OTU 1095	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	Koribacteraceae	Candidatus Koribacter
	OTU 275	Acidobacteriota	Vicinamibacteria	Vicinamibacterales	unclassified Vicinamibacterales	
	OTU 885	Acidobacteriota	Vicinamibacteria	Vicinamibacterales	unclassified Vicinamibacterales	
	OTU 123	Actinobacteriota	Thermoleophila	Gaiellales	Gaiellaceae	Gaiella
	OTU 476	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	unclassified Burkholderiales	
	OTU 569	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	unclassified Burkholderiales	
Couche ZB	OTU 427	Acidobacteriota	unclassified Acidobacteriota			
	OTU 986	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Blastocatellales	unknown family	Paludibaculum
	OTU 4392	Bacteroidota	Kryptonia	Kryptoniales	unclassified Kryptoniales	
	OTU 878	Bacteroidota	Kryptonia	Kryptoniales	unclassified Kryptoniales	
	OTU 2565	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Leptolinea
	OTU 1772	Chloroflexi	Anaerolineae	unclassified Anaerolineae		
	OTU 126	Chloroflexi	Dehalococcoidia	unclassified Dehalococcoidia		
	OTU 254	Chloroflexi	Dehalococcoidia	unclassified Dehalococcoidia		
	OTU 601	Chloroflexi	unclassified Chloroflexi			
	OTU 1493	Desulfobacterota	Desulfobacteria	Desulfatiglandales	Desulfatiglandaceae	Desulfatiglans
	OTU 294	Desulfobacterota	Desulfuromonadia	Geobacterales	Geobacteraceae	unclassified Geobacteraceae
	OTU 425	Fibrobacterota	Chitinivibrionia	unclassified Chitinivibrionia		
	OTU 874	Latescibacterota	unclassified Latescibacterota			
	OTU 1164	Planctomycetota	Phycisphaerae	unclassified Phycisphaerae		
	OTU 3320	Planctomycetota	Planctomycetes	Pirellulales	Pirellulaceae	unclassified Pirellulaceae
	OTU 177	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Spirochaeta
OTU 2810	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	Spirochaetaceae	unclassified Spirochaetaceae	
OTU 509	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	Spirochaetaceae	unclassified Spirochaetaceae	
OTU 2335		unclassified Bacteria				
Couche MH	OTU 1898	Acidobacteriota	Acidobacteriae	unclassified Acidobacteriae		
	OTU 49	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	unclassified Acidobacteriales	
	OTU 808	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Solibacterales	Solibacteraceae	Candidatus Solibacter
	OTU 76	Acidobacteriota	Holophagae	unclassified Holophagae		
	OTU 1093	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	unclassified Anaerolineaceae
	OTU 1223	Fibrobacterota	Fibrobacteria	Fibrobacterales	unclassified Fibrobacterales	
	OTU 1837	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	unclassified Oscillospirales	
	OTU 1079	Nitrospirota	unclassified Nitrospirota			
	OTU 1	Planctomycetota	Planctomycetes	Isosphaerales	Isosphaeraceae	Aquisphaera
	OTU 2076	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocystis
	OTU 233	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methyloligellaceae	unclassified Methyloligellaceae

Ces résultats démontrent que la couche de sol correspondant à la zone blanchâtre, caractérisée par une contamination en uranium provenant d'anciennes activités minières, a une composition bactérienne bien spécifique comparée aux autres couches. En effet, 19 OTUs sont spécifiques à cette couche ZB et conduisent à discriminer cette couche des autres horizons de la carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancienne mine de Rophin. En particulier, 5 OTUs spécifiques à cette couche appartiennent au phylum *Chloroflexi*. Il est intéressant de noter que la présence majoritaire du phylum *Chloroflexi* dans un sol contaminé en uranium est à ce jour peu renseignée dans la littérature. Bien que le phylum des *Chloroflexi* soit fréquemment identifié dans des environnements profonds, leur potentiel métabolique est

peu connu car très divers (phototrophie anoxique, fermentation et déshalogénéation réductrice) (Fullerton et Moyer., 2016). Par conséquent, les fonctions potentielles de ces organismes ne peuvent pas être attribuées en se basant uniquement sur la phylogénie (Fullerton et Moyer, 2016). De plus, la présence d'OTUs affiliée à *Geobacteraceae* et *Desulfatiglans* spécifique uniquement à la couche ZB est très intéressante du fait que ce sont des bactéries ferro-réductrices et sulfato-réductrices, qui peuvent jouer un rôle actif dans la réduction de l'uranium (VI) soluble sous sa forme (IV) insoluble (Brodie et al., 2006 ; Mondani et al., 2011 ; Sitte et al., 2015 ; Sutcliffe et al., 2017 ; Suzuki et al., 2014).

Les autres couches de sol (MO et MH) sont également caractérisées par des OTUs spécifiques à chacune d'entre elles. Les OTUs spécifiques dans la couche MO appartiennent aux phylums des *Acidobacteriota* et *Proteobacteria*. Ces deux phylums sont très ubiquistes dans l'environnement et sont impliquées dans de nombreux cycles géochimiques, dont celui du carbone, de l'azote et du soufre (Kielak et al., 2016 ; Spain et al., 2009). De plus, il est intéressant de noter que des OTUs affiliées à l'ordre des *Vicinamibacterales* sont uniquement observées dans la couche MO. La famille *Vicinamibacteraceae*, représentante principale de l'ordre des *Vicinamibacterales*, a été récemment décrite comme présentant des bactéries aérobies, neutrophiles et chimio-hétérotrophes (Dedysh et Yilmaz, 2018 ; Huber et Overmann, 2018), pouvant expliquer leur présence majoritaire dans la couche de surface MO où la concentration en carbone organique est la plus élevée. En outre, les OTUs spécifiques à la couche MH sont principalement affiliées au phylum *Acidobacteriota*, probablement impliqué dans la dégradation de la matière organique présente dans cette couche. Des OTUs favorables aux conditions anoxiques telles que *Holophagae*, *Anaerolineaceae* ou *Oscillospirales* ont été identifiées dans cette couche.

Ces trois couches de sol sont donc discriminées les unes des autres par la présence d'OTUs spécifiques à chacune. Des bactéries réductrices de fer et des sulfates, qui ont le potentiel d'atténuer la toxicité de l'uranium et d'autres métaux par la réduction enzymatique et/ou abiotique des ions métalliques, ont été trouvées dans la zone blanchâtre caractérisée par de fortes concentrations en uranium (Sitte et al., 2015). Dans d'autres environnements contaminés en RN et ETM, il est connu que la composition des communautés bactériennes est spécifique aux niveaux de concentration et/ou aux différentes conditions environnementales géologiques et physiologiques (Lopez-Fernandez et al., 2021). Néanmoins, il est difficile de déterminer si ces communautés spécifiques dans la couche ZB, par rapport aux couches MO et MH sont dues à la contamination en uranium et éléments traces métalliques provenant des

anciennes activités minières dans la couche ZB. Il semble donc important de déterminer si les fortes concentrations en radioéléments, notamment l'uranium, dans la couche ZB pourraient expliquer la présence de ces OTUs spécifiques, et si ces OTUs pourraient jouer un rôle dans la biogéochimie de ces radioéléments.

b) Corrélation entre ces OTUs spécifiques et les paramètres physico-chimiques des couches de sol

Par la suite, il convient d'observer si ces OTUs spécifiques, notamment de la couche ZB, sont discriminées par les concentrations en radioéléments par rapport aux autres paramètres physicochimiques. Les relations entre les OTUs spécifiques et les paramètres physicochimiques de chaque couche de la carotte de sol ont été mises en évidence à partir du cercle de corrélation (Figure 53) de l'analyse sPLS. Le cercle de corrélation permet d'observer les variables qui sont responsables de la répartition des échantillons dans l'espace. En complément, une carte d'image des clusters (heatmap) a été réalisée afin d'observer la structure des corrélations extraites des deux jeux de données (Annexe 2 :).

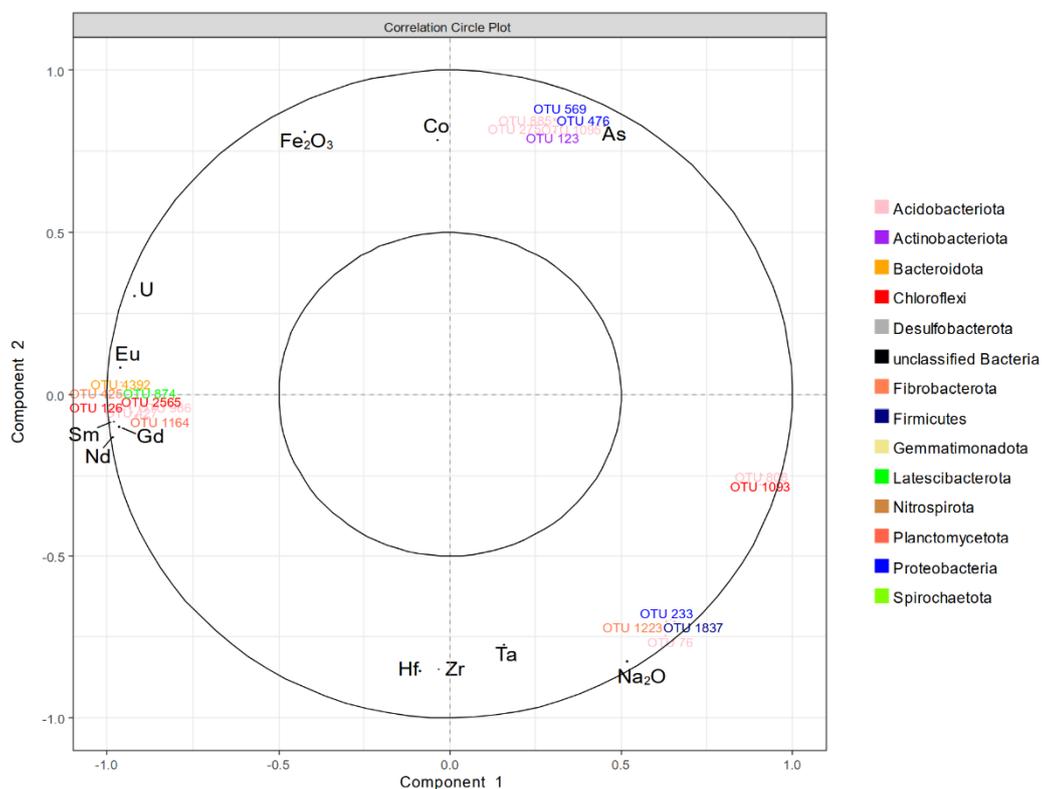


Figure 53: Cercle de corrélation de l'analyse sPLS mettant en évidence les relations entre les OTUs spécifiques et les paramètres physicochimiques de chaque couche de sol de la carotte de Rophin (2020).

A partir du cercle de corrélation (Figure 53) et du heatmap (Annexe 2 :), 3 clusters d'OTUs ont pu être identifiés, chacun corrélé à différents paramètres physicochimiques spécifiques à chaque horizon. En particulier, bien que l'uranium et les lanthanides soient des éléments toxiques pour les bactéries, des corrélations positives ont été observées entre les fortes concentrations en uranium (U), europium (Eu), samarium (Sm), gadolinium (Gd), et néodyme (Nd) mesurées dans la couche ZB et 8 OTUs spécifiques à cette couche (*Paludibaculum*, *Acidobacteriota*, *Leptolinea*, *Dehalococcoidia*, *Chitinivibrionia*, *Latescibacterota*, *Kryptoniales* et *Phycisphaerae*). Ces résultats démontrent que l'uranium, apporté par cette contamination due aux activités minières, influence la structuration des communautés bactériennes le long de cette carotte de sol, en particulier dans la couche ZB. Ces OTUs possèdent donc un métabolisme particulier qui leur permet de se développer dans cette couche de sol caractérisée par de fortes concentrations en uranium.

En particulier, parmi ces OTUs, 2 OTUs semblent pouvoir intervenir dans la spéciation et la biodisponibilité de l'uranium. La première OTU est affiliée à la classe *Phycisphaerae* (*Planctomycetota*), et pourrait réduire la biodisponibilité de l'uranium par biosorption, comme observée dans une tourbière ombrotrophe (Lusa et Bomberg, 2021). La deuxième OTU est associée au genre *Paludibaculum* (*Acidobacteriota*) dont des espèces bactériennes associées à ce genre, telle que *Paludibaculum fermentans* isolée d'une zone humide, sont connues pour être capables de réduire le fer en conditions anaérobies (Kulichevskaya et al., 2014). Cette réduction leur permet d'obtenir de l'énergie pour leur croissance par transport d'électrons vers le Fe(III) comme accepteur d'électrons (Lloyd, 2003). Or, les souches bactériennes capables de réduire le Fe(III) sont potentiellement capables d'utiliser l'U(VI) comme accepteur d'électrons, entraînant la réduction d'U(VI) soluble en U(IV) insoluble (Lovley et al., 1991 ; Cardenas et al., 2008 ; Gihring et al., 2011). Par conséquent, cette OTU associée au genre *Paludibaculum*, pourrait entraîner une précipitation de l'uranium par bioréduction dans cette couche de sol ZB, le rendant donc moins biodisponible pour les autres organismes vivants, et donc moins toxique (Kolhe et al., 2018 ; Lovley et al., 1991 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008). Par conséquent, ces OTUs pourraient jouer un rôle important dans la spéciation et la migration de l'uranium dans cette carotte de sol.

Outre ces bactéries capables d'interagir avec l'uranium, 2 OTUs affiliées au phylum *Chloroflexi* dont 1 OTU est affiliée à la classe *Dehalococcoidia* et 1 OTU est affiliée au genre *Leptolinea* (famille *Anaerolineaceae*) sont également corrélées à la concentration en uranium et lanthanides dans cette couche ZB. La présence de bactéries fermentaires associées au genre

Leptolinea et à classe *Dehalococcoidia* ont également déjà été observées dans des sites contaminés en uranium (Cardenas et al., 2010 ; Hug et al., 2013 ; Sutcliffe et al., 2017). Ces 2 OTUs possèdent un potentiel pour des modes de vie hétérotrophes polyvalents, notamment la fermentation, la fixation du CO₂ et l'acétogénèse (Hug et al., 2013 ; Jroundi et al., 2020). Par conséquent, une relation syntrophique pourrait être mis en place entre les espèces bactériennes réductrices de métaux, telle que *Paludibaculum*, et des espèces fermentaires telles que *Dehalococcoidia* et *Leptolinea* (Sutcliffe et al., 2017). En effet, ces bactéries fermentaires pourraient excréter de l'acétate, utilisé ensuite comme donneur d'électrons et/ou comme source de carbone par des bactéries qui respirent l'uranium et le fer, tel que *Paludibaculum*, ce qui soutiendrait leur croissance dans cette carotte de sol et, de ce fait, la bioréduction de l'uranium. Cette immobilisation de l'uranium par bioréduction, réduirait sa biodisponibilité et sa toxicité pour les communautés fermentaires, ce qui favoriserait leur croissance dans cet environnement. Par conséquent, cette co-corrélation entre des bactéries ferro-réductrices (*Paludibaculum*) et des bactéries fermentaires (*Dehalococcoidia* et *Leptolinea*) avec les fortes concentrations en uranium dans la couche ZB, reflètent des associations de bactéries remplissant des fonctions complémentaires permettant leur croissance dans cette couche de sol.

Des OTUs spécifiques corrélées aux paramètres physicochimiques des couches MO et MH ont également été identifiées. Pour la couche MO, 6 OTUs spécifique à cette couche (*Koribacteraceae*, *Vicinamibacterales*, *Gaiella* et *Burkholderiales*) sont positivement corrélées aux fortes concentrations en arsenic (As), oxyde de fer (Fe₂O₃) et cobalt (Co), et de faibles concentrations en oxyde de sodium (Na₂O), tantale (Ta), zirconium (Zr), et hafnium (Hf) mesurées dans cette couche. A de fortes concentrations, l'arsenic et le cobalt sont deux éléments connus pour leurs effets toxiques sur les bactéries (Fashola et al., 2016). Cependant, certaines bactéries, telles que *Koribacteraceae*, *Vicinamibacterales* et *Burkholderiales*, sont capables de se développer dans ces environnements contaminés en As et Co (Chun et al., 2021 ; Luo et al., 2013 ; Wang et al., 2018), en mettant en place divers mécanismes pour résister à leur présence (Fashola et al., 2016). En particulier, les bactéries associées au genre *Burkholderiales* possèderaient des gènes associés à diverses stratégies de résistance à l'arsenic et au cobalt (Li et al., 2014 ; Siunova et al., 2009). Pour la couche MH, 6 OTUs spécifiques à cette couche sont corrélées aux concentrations en oxyde de sodium (Na₂O), tantale (Ta), zirconium (Zr), hafnium (Hf), et de faibles concentrations en uranium (U), europium (Eu), samarium (Sm), gadolinium (Gd), néodyme (Nd) et oxyde de fer (Fe₂O₃) mesurées dans cette couche. Les membres de la famille *Hungateiclostridiaceae* sont des organismes chimiohétérotrophes anaérobie

obligatoires capables de produire de l'acétate et du dihydrogène (H₂) à partir de la fermentation de saccharides (Zhang et al., 2018). Cette OTU appartenant à la famille *Hungateiclostridiaceae* pourrait être trouvée spécifiquement dans la couche MH du fait de sa relation syntrophique avec les bactéries métallo-réductrices (telles que *Holophagae*), en leur apportant de l'acétate ou H₂ comme donneur d'électrons.

Néanmoins, nos résultats montrent que la présence de ces OTUs n'est pas associée à la présence d'un seul composé mais plutôt à un ensemble de co-corrélations avec divers paramètres physico-chimiques. Comme les microorganismes ne sont jamais confrontés à un seul contaminant sur le terrain, il est difficile de différencier les effets d'une seule espèce métallique sur les communautés microbiennes *in situ* (Sitte et al., 2015 ; Rogiers et al., 2021). De plus, des changements de facteurs physico-chimiques (pH, potentiel redox, taux d'oxygène) présents le long de cette carotte affecte également à la fois les populations microbiennes et la spéciation des métaux. Des recherches supplémentaires sur la part disponible, et plus particulièrement biodisponible, permettraient de mieux comprendre l'effet des métaux et radionucléides sur les différentes communautés bactériennes présentes le long de cette carotte de sol.

III- Conclusion

L'étude des communautés bactériennes d'une carotte de sol d'une zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin a permis de confirmer que les fortes concentrations en radionucléides d'origine naturels renforcés par des activités humaines (TENORM) ont influencé la structure et la diversité de ces communautés bactériennes. En particulier, une diminution de la diversité et une augmentation de la richesse dans la couche de sol ZB pourrait être expliquée par de fortes concentrations en uranium mesurées dans cette couche, entraînant une diminution des espèces dominantes et une augmentation d'espèces rares peu représentées dans cette couche. Les trois couches de sol échantillonnées (MO, ZB et MH) sont caractérisées par des OTUs spécifiques à chacune d'entre elles. Particulièrement, la couche de sol ZB correspondant à la zone blanchâtre, caractérisée par une contamination en uranium, est discriminée des autres couches par la présence de 19 OTUs prédominantes. Parmi ces OTUs, huit se sont révélées corrélées aux fortes concentrations en uranium dans cette couche. Ces bactéries ont développé des processus de résistances à ces métaux et radionucléides, qui consistent souvent en des changements d'état d'oxydation de ces radionucléides/métaux

toxiques. Ces processus microbiologiques peuvent donc affecter la solubilité et la biodisponibilité des ETM et radionucléides, et réduire la toxicité de ces éléments sur la biosphère. En outre, des associations de bactéries, remplissant des fonctions complémentaires, favoriseraient leur croissance dans cet environnement. En résumé, ces fortes concentrations en radionucléides et métaux mesurées dans ces différentes couches ont entraîné une sélection d'espèces bactériennes capables de survivre et de se développer dans cette zone humide.

Pour finir, il est difficile de déterminer les fonctions des bactéries présentes dans chacune des couches uniquement par metabarcoding. Pour répondre à cette question, l'analyse des fonctions bactériennes globales par métagénomique a également été effectuée sur ces échantillons de sol de la carotte de Rophin. Cette méthode permet d'étudier le métagénome de ces échantillons, c'est-à-dire l'ensemble des génomes des communautés microbiennes dans ces couches de sol. Elle permet par conséquent de décrire le fonctionnement global du métagénome en séquençant l'ensemble des gènes présents. Cependant, à cause des fortes pressions sur les plateformes de séquençage dues aux périodes perturbées par le COVID 19 en 2020 et 2021, ces résultats ne sont toujours pas disponibles et n'ont pas pu être présentés dans cette thèse. Cette analyse permettra de se focaliser sur les fonctions impliquées dans la spéciation et la résistance à l'uranium. Parmi ces fonctions, les transporteurs spécifiques de métaux lourds (Nongkhlaw et Joshi et al., 2019), les sidérophores sécrétés permettant la chélation de métaux (dont l'uranium) (Hesse et al., 2018 ; Rashmi et al., 2013), les gènes liés au cytochrome de type C permettant la réduction de l'uranium (Rogiers et al., 2022) ou la production de métallothionéines (protéines contrôlant la biodisponibilité des métaux essentiels mais également favorisant la rétention et/ou l'excrétion de métaux toxiques (Ziller et Fraissinet-Tachet, 2018)) pourront être recherchées pour mieux comprendre comment ces communautés bactériennes s'adaptent et se développent dans ces environnements contaminés en radioéléments et éléments traces métalliques.

Chapitre 5 : Caractérisation des
mécanismes d'interaction
entre des isolats indigènes et
l'uranium

I- Contexte général et objectifs

Ce dernier chapitre est axé sur l'étude des interactions entre des bactéries, isolées dans les sources minérales radioactives et l'ancien site minier de Rophin, et l'uranium. Effectivement, comme observé dans les deux chapitres précédents, la présence de radioéléments, notamment d'uranium, dans ces deux environnements a entraîné une sélection d'espèces bactériennes capables de se développer dans ces conditions particulières. Cela signifie que ces communautés seraient adaptées à ces conditions pour s'y développer. Cette adaptation peut être liée à leur capacité à interagir avec l'uranium, par divers mécanismes, tels que la biosorption, la biominéralisation, la bioaccumulation ou la bioréduction (mécanismes décrits dans le chapitre 1). Ces processus d'interaction avec l'uranium consistent souvent en des changements de l'état d'oxydation de ce radionucléide, entraînant généralement une immobilisation de celui-ci, pouvant entraîner une diminution de leur biodisponibilité. Cette immobilisation de l'uranium par les bactéries permet de réduire sa biodisponibilité et par conséquent sa toxicité, favorisant le développement des souches bactériennes identifiées dans les sources minérales et le site de Rophin. Il paraît donc intéressant d'étudier les bactéries présentes dans ces environnements afin de comprendre les mécanismes d'interactions mis en place avec l'uranium leur permettant de se développer dans ces conditions particulières. Pour cela, des études en conditions contrôlées de laboratoire à partir de culture des bactéries isolées de ces deux environnements radioactifs sont indispensables.

Les objectifs de l'étude présentée dans ce dernier chapitre sont de :

- Isolement et identification de souches bactériennes de ces deux sites, et sélection des souches potentiellement radiotolérantes ou connues pour interagir avec des radioéléments/métaux
- Mettre en évidence la résistance à l'uranium des souches bactériennes présélectionnées
- Comprendre les mécanismes d'interactions des souches les plus résistantes avec l'uranium, et explorer leur potentiel d'élimination de ce radioélément

Dans ce chapitre, seules les souches isolées des sources minérales sont présentées. Bien que l'objectif initial fût d'isoler des souches bactériennes provenant des sources minérales et de la carotte de Rophin, les prélèvements des échantillons de la carotte de sol dans la zone humide de Rophin, prévus initialement au mois de mars 2020 dans le cadre du projet INSPECT, n'ont pas pu être effectués en temps voulu du fait du confinement lié à la pandémie du COVID-19. Ces prélèvements ont été finalement effectués en juin 2021, retardant l'isolement des souches provenant de cette carotte. En conséquence, il a donc été décidé de travailler avec des souches bactériennes isolées à partir de l'eau et des sédiments du ruisseau (Le Gourgeat) situé à l'aval de l'ancien site minier de Rophin (Projet TREMPIN : 2017 – 2019 décrit dans le chapitre 2) pour rester dans le même contexte d'un environnement présentant une radioactivité naturelle renforcée par des activités humaines (TENORM). Néanmoins, l'isolement et l'identification des souches de la carotte de sol, prélevée dans la zone humide à l'aval du site de Rophin en juin 2021, a été réalisée avant la fin de cette thèse, et les résultats sont présentés en Annexe 3 :

II- Isolement de souches bactériennes des sources minérales naturellement radioactives

Pour cette étude sur la culture des communautés bactériennes, des échantillons d'eau provenant de sept sources minérales radioactives (3 Sauts, Bard, Dourieux, Graviers, Montagne, Salins et Mariol), aux concentrations en radioéléments variables, ont été sélectionnées et échantillonnées. Comme décrit dans le chapitre 2, ces sources présentent des concentrations en radioéléments élevés dans l'eau par rapport au fond géochimique (Tableau 6 – Chapitre 2). En particulier, la source de Salins présente une forte concentration en uranium 238, alors que les sources de Mariol, Bard et Graviers présentent une concentration en radium 226 plus élevées par rapport aux autres sources. De plus, la concentration en radon 222 mesurées les sources de 3 Sauts, Dourieux, Montagne est très élevées, en particulier pour les deux dernières. Peu d'études ont recherché les communautés bactériennes cultivables tolérantes au stress induit par des concentrations en radon, radioéléments et métaux élevées dans des eaux minérales (Nayak et al., 2019). De ce fait, la culture de bactéries, dans ces sources minérales chargées en radioéléments, est une bonne opportunité pour isoler des souches bactériennes potentiellement radiotolérantes capables d'interagir avec des radioéléments ou métaux.

1) Isolement et identification des souches isolées dans les sources minérales

La culture bactérienne a été réalisée sur un milieu nutritif non sélectif (Tryptic Soja Broth – TSB) solide afin d’obtenir la plus large gamme de bactéries présentes dans les échantillons d’eau des sources minérales. Le protocole réalisé pour la mise en culture des souches bactériennes des eaux des sources minérales est décrit dans le chapitre 2. Une collection d’isolats bactériens cultivables aérobies a ainsi été constituée pour chaque source étudiée. Au total, pour la culture bactérienne des échantillons d’eaux des sept sources, réalisée sur milieu TSB, 625 souches bactériennes ont été isolées. Par la suite, l’ADN de ces souches est extrait, puis le gène de l’ARN 16S est amplifié par PCR pour chaque ADN bactérien purifié. Les portions amplifiées sont ensuite séquencées par la méthode de Sanger, réalisée par la société Genewiz (Allemagne). Enfin, les séquences des souches obtenues sont comparées aux banques de données (NCBI) grâce au logiciel BLASTn. Les séquences sont ainsi classées par unité taxonomique opérationnelle (OTU), une OTU étant un regroupement d’individus d’une même espèce dont les séquences d’ADNr 16S présentent une similitude de plus de 97%. Au total, 295 OTUs ont été identifiées, réparties sur 4 phylums. Les deux histogrammes ci-dessous représentent le nombre de souches isolées et le nombre d’OTUs obtenues par source (Figure 54.a), puis l’abondance relative de chaque phylum dans chaque source (Figure 54.b).

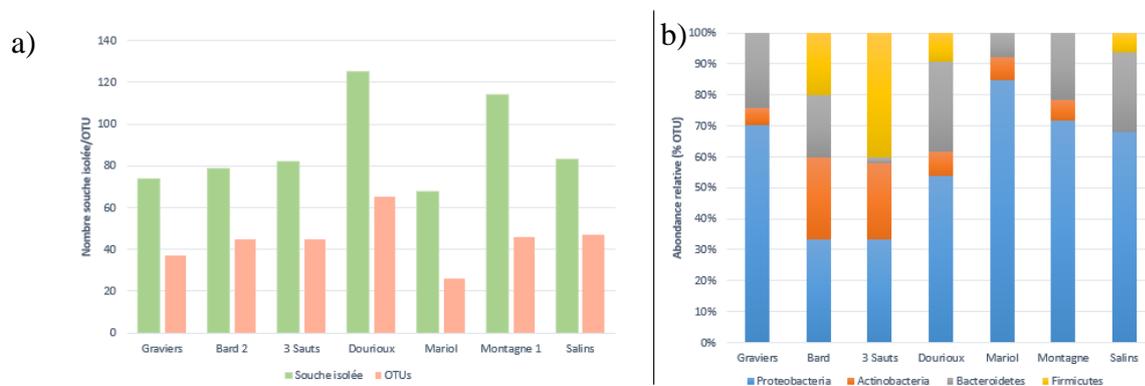


Figure 54: a) Nombre de souches isolées et nombre d’OTUs obtenues dans chaque source; b) Abondance relative (%) de chaque phylum obtenue pour chaque échantillon d’eau de source minérale étudié

Les bactéries isolées dans ces sources minérales naturellement radioactives se répartissent en 4 phylums : *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Firmicutes*. Ces phylums sont souvent isolés dans des environnements extrêmes tels que des sédiments d’une rivière contaminée en uranium et éléments traces métalliques (Suriya et al., 2017), des minerais d’uranium provenant d’une mine (Islam et Par., 2011), des eaux interstitielles provenant de dépôts de résidus miniers d’uranium (Sánchez-Castro et al., 2017), de sols provenant de la zone

d'exclusion de Tchernobyl (Chapon et al., 2012) et d'eaux souterraines contaminées en radon et autres éléments traces métalliques en Inde (Nayak et al., 2019).

Les *Proteobacteria* sont le phylum le plus majoritairement représenté (Figure 54.b), variant de 30% dans la source de Bard, à plus de 80% dans la source de Mariol. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études sur les communautés bactériennes présentes dans des environnements radioactifs où les *Proteobacteria* ont également été isolées en majorité (Islam et Sar., 2011 ; Nayak et al., 2019 ; Sánchez-Castro et al., 2017). Au total, les *Proteobacteria* regroupent 170 OTUs avec des isolats apparentés à 3 classes : *Alphaproteobacteria* (62 OTUs) avec majoritairement des isolats affiliés aux genres *Caulobacter*, *Rhizobium* et *Brevundimonas*. La classe des *Betaproteobacteria* regroupe 37 OTUs, dont des souches majoritairement apparentées aux genres *Duganella* et *Variovorax*. Enfin, la classe des *Gammaproteobacteria* est représentée par 71 OTUs, avec principalement des souches appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* et *Shewanella*. L'embranchement des *Bacteroidetes*, dont 60 OTUs ont été identifiées, a également été détecté dans chacune des sources étudiées. Les souches isolées, appartenant aux *Bacteroidetes*, étaient essentiellement associées aux genres *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* et *Pedobacter*. Les *Firmicutes* ont été détectés dans les sources de Bard, 3 Sauts, Dourieux et Salins. Ils sont représentés par 33 OTUs, avec des isolats liés principalement aux genres *Bacillus*, et *Paenibacillus*. Enfin les *Actinobacteria*, ont été détectés dans toutes les sources sauf celle de Salins. Ce phylum était représenté par 32 OTUs, avec majoritairement des souches isolées apparentées aux genres *Microbacterium* et *Streptomyces*. Les différents arbres phylogénétiques obtenus pour chaque source sont donnés en Annexe 4 :

2) Souches isolées potentiellement tolérantes aux radioéléments/métaux

Une étude bibliographique a permis de déterminer que de nombreuses souches isolées dans ces sources sont associées à des espèces bactériennes qui ont été étudiées pour leur capacité à tolérer de fortes concentrations en radioéléments/métaux, et à interagir avec eux. En effet, la présence de bactéries dans ces sources caractérisées par de fortes concentrations en radioéléments, comme l'uranium et le radon, dépend de leur capacité à résister à cette toxicité grâce à différentes stratégies de survie (Nayak et al., 2019). Le Tableau 13 ci-dessous résume quelles souches bactériennes isolées de ces sources sont connues dans la littérature pour tolérer et/ou interagir avec des radioéléments/métaux.

Tableau 13 : Synthèse bibliographique des souches isolées des sources minérales associées à des espèces bactériennes connues pour tolérer et/ou interagir avec des métaux et/ou des radioéléments

Label souche isolée	Souche affiliée (N°Accession)	Sources	Tolérance et/ou interaction avec métaux/radioéléments	Auteurs	
Actinobacteria					
O19 B2 ND3 8	<i>Arthrobacter sp. strain 810</i> (MT585987)	Bard	Plusieurs souches apparentées à <i>Arthrobacter sp.</i> ont été étudiées pour leur capacité à tolérer et interagir avec plusieurs éléments traces métalliques/radioéléments via différents mécanismes (biosorption, bioaccumulation bioréduction)	Benyehuda et al., 2003 ; Hanbo et al., 2004 ; Hlihor et al., 2017 ; Martinez et al., 2006 ; Nakajima et Tsuruta, 2004 ; Pathak et al., 2020 ; Suzuki et Banfield, 2004 ; Swer et al., 2016 ; Xiao et al., 2017	
O19 DO -3 2 2	<i>Janibacter sp. strain 49185</i> (KU598922)	Dourioux	Cette espèce bactérienne a déjà été isolée dans des eaux souterraines utilisées pour le stockage de déchets radioactifs liquides	Nazina et al., 2020	
O19 LE ND3 8 O19 LE ND3 9 O19 LE -1 3 1	<i>Microbacterium aurantiacum</i> isolate K21-17 (LN650581)	3 Sauts	Le genre <i>Microbacterium</i> a déjà été isolée dans des environnements radioactifs.	Islam et Sar., 2016 Gallois et al., 2018 Theodorakopoulos et al., 2015 Nedelkova et al., 2007 Sánchez-Castro et al., 2017	
O19 M1 -2 1 19	<i>Microbacterium hatanonis strain IHBB 9313</i> (KR085807.1)	Montagne			
O19 GR ND1 6	<i>Microbacterium maritypicum strain P6F90</i> (MN421311)	Graviers	<i>Microbacterium oleivorans</i> A9 (isolée d'un échantillon de sol de Tchernobyl) a démontré une tolérance à de fortes concentrations en uranium grâce à des mécanismes actifs favorisant l'efflux du métal de la cellule, ainsi que l'accumulation intracellulaire sous forme de minéraux		
O19 M1 -1 2 11	<i>Microbacterium natoriense strain MLS-3-2</i> (KU204871.1)	Montagne			
O19 LE -1 1 1 O19 LE -1 1 8 O19 LE -2 1 1	<i>Microbacterium sp. strain C3K049</i> (MN989092)	3 Sauts	<i>Microbacterium oxydans</i> isolée dans des eaux souterraines contaminées en radioéléments et capable d'interagir avec l'uranium via bioaccumulation intracellulaire, biosorption à leur surface cellulaire et biominéralisation extracellulaire sous forme de phosphate d'uranium.		
O19 GR -1 1 2	<i>Microbacterium sp. strain EB2016-147</i> (MN367117)	Graviers			
O19 LE -2 3 7	<i>Microbacterium sp. strain HBUM206337</i> (MT541009)	3 Sauts			
O19 LE -1 3 4	<i>Microbacterium oxydans strain NR69-1</i> (MT533951)	3 Sauts			
O19 DO -1 2 18	<i>Rhodococcus sp. strain YF-9</i> (MT631993)	Dourioux	<i>Rhodococcus opacus</i> DSM 43205 est capable de résister aux métaux (Fe(III), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Ni(II), et Pb(II)) et d'interagir avec eux. Le mécanisme d'interaction repose principalement en une biosorption rapide, suivie de leur absorption à l'intérieur des cellules.		Goswami et al., 2017
O19 B2 -2 1 6	<i>Rhodococcus tukisamuensis strain DSM 44783</i> (KF410353)	Bard			

O19 B2 -1 1 2	<i>Streptomyces sp. 3474</i> (DQ663160)	Bard		
O19 M1 -1 2 10	<i>Streptomyces sp. strain 1-2 Str</i> (KY363605.1)	Montagne	Plusieurs souches apparentées à <i>Streptomyces sp.</i> , ont démontré une forte tolérance aux métaux (Pb, Zn, Cu, Cd, Cr, Fe ou Ni) ou aux radiations. Par exemple, la souche <i>Streptomyces levoris</i> a démontré sa capacité à adsorber l'uranium et le thorium mais également à les bioaccumuler	Cimermanova et al., 2021 El Baz et al., 2015 Schmidt et al., 2007 Mao et al., 2007 Tsuruta, 2004 Tsuruta, 2006
O19 DO ND3 4	<i>Streptomyces sp. strain QHHL-27</i> (MN938170)	Dourieux		
O19 DO -2 3 6	<i>Streptomyces urticae strain</i> NEAU-PCY-1 (NR_164909)	Dourieux		
O19 DO ND3 3	<i>Streptomyces fulvissimus S32-76</i> (LC551888)	Dourieux		
Bacteroidetes				
O19 LE -2 1 5 O19 LE ND3 7 O19 LE -1 3 12	<i>Algoriphagus litoralis strain DSL-12</i> (NR_164979)	3 Sauts	Le genre <i>Algoriphagus</i> a démontré une forte capacité à se développer dans des environnements radioactifs étant donné qu'il a déjà été isolé à partir d'un bassin de stockage de combustible usé	Ruiz-Lopez et al., 2020
O19 B2 -1 1 9	<i>Algoriphagus sp. THG-DN5.6</i> (KM035948)	Bard		
S20 SAB -3 2 6	<i>Chryseobacterium sp. dR1-22</i> (HQ436418.1)	Salins	<i>Chryseobacterium sp. strain PMSZPI</i> (isolée d'un sol de gisement d'uranium) présente des propriétés de résistance multi-métallique, dont l'uranium, du fait de la présence de gènes associés à cette résistance. Cette souche bioprécipite l'uranium par son activité phosphatase	Khare et al., 2020 Nongkhlaw et Joshi, 2019
O19 DO -2 1 19	<i>Chryseobacterium sp. JM80</i> (MN758840)	Dourieux		
O19 GR -1 1 12	<i>Chryseobacterium sp. MM85Nov</i> (KJ482745)	Graviers		
O19 GR ND1 4	<i>Chryseobacterium sp. strain ICMP</i> 22287 (MH392628)	Graviers		
O19 M1 -1 3 2	<i>Cytophaga sp. 4D9</i> (EF395377.1)	Montagne	<i>Dyadobacter sp.</i> et <i>Cytophaga sp.</i> ont la capacité à se développer dans des environnements aux concentrations en métaux et radiations élevées	Anitori et al., 2002 Arroyo-Herrera et al., 2021 Ellis et al., 2003 ; Ivanitsa et al., 1999 Sprocati et al., 2014
O19 M1 -1 2 6	<i>Dyadobacter hamtensis strain</i> MT_SG_E_25_P1.27F (MN684244.1)	Montagne		
O19 B2 -2 2 5	<i>Flavobacterium sp. A1-28</i> (KF441562)	Bard	<i>Flavobacterium sp. A1-28</i> a été isolée de sédiments et d'eau prélevés dans une mine d'uranium (Urgeirica, Portugal)	Chung et Morais, 2014 (KF441562)
O19 DO -1 3 2	<i>Sphingobacteriaceae bacterium</i> (EU723122)	Dourieux		Islam et al., 2011 Rastogi et al., 2010

O19 DO -1 3 6 O19 B2 -1 2 2	<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> strain P5M31 (MN421436)	Dourieux Bard	Des souches bactériennes appartenant au genre <i>Sphingobacterium</i> ou à l'ordre <i>Sphingobacteriales</i> ont été isolées de site minier d'uranium		
Firmicutes					
O19 LE -2 3 1	<i>Bacillus megaterium</i> strain BRN1 (MT310821)	3 Sauts	<i>Bacillus sp.</i> est une espèce bactérienne sporulante. La sporulation est une stratégie utilisée par les bactéries pour survivre dans des environnements extrêmes.		
O19 B2 ND1 8	<i>Bacillus mobilis</i> strain HFBP14 (MT538261)	Bard			
O19 LE ND2 7	<i>Bacillus mycoides</i> strain CRBJ5 (MT478147)	3 Sauts	De plus, de nombreuses espèces de <i>Bacillus sp.</i> ont été isolées dans des environnements contaminés en radionucléides et étudiées pour leur capacité à interagir avec l'uranium (biosorption, biominéralisation, bioréduction), permettant sa précipitation dans l'environnement dans diverses conditions environnementales (aérobie ou anaérobie).	Chapon et al., 2012 Li et al., 2014 Li et al., 2017 Li et al., 2021 Lopez-Fernandez et al., 2014 Pan et al., 2015 Sánchez-Castro et al., 2017 Tawfik et al., 2005 Wei et al., 2019 Zhang et al., 2018	
O19 B2 -1 1 8	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> strain 373_C13H (MK484327)	Bard			
S20 SAO ND2 2	<i>Bacillus simplex</i> isolate BD17-S24 (HF584831)	Salins			
O19 DO ND3 8	<i>Bacillus simplex</i> strain J8BS1 (MT415971)	Dourieux	Par exemple des membres appartenant à <i>Bacillus thuringiensis</i> , étroitement lié avec la souche O19 LE ND1 4, ont démontré une interaction avec l'uranium, le processus consistant en une biosorption extracellulaire et une biominéralisation intracellulaire. De plus, une étude a démontré que <i>Bacillus megaterium</i> , également isolée dans ces sources, pouvait adsorber l'uranium à sa surface cellulaire et qu'une modification de sa surface par l'application d'alginate de sodium pouvait améliorer la capacité d'adsorption de cette espèce bactérienne		
O19 B2 -1 1 1	<i>Bacillus sp.</i> strain C4_RS_19 (MT354494)	Bard			
S20 SAB -3 1 9	<i>Bacillus sp.</i> strain HBUM207125 (MT598008.1)	Salins			
O19 LE -1 1 4	<i>Bacillus sp.</i> B013-22 (KJ190973)	3 Sauts			
O19 LE ND1 4	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HER1410 (CP050183)	3 Sauts			
O19 LE ND2 1	<i>Bacillus toyonensis</i> strain WS2-2 (MT605503)	3 Sauts			
O19 LE ND3 4	<i>Paenibacillus sp.</i> 37 (CP043761)	3 Sauts	Comme <i>Bacillus sp.</i> , <i>Paenibacillus sp.</i> peut former des spores leur permettant une protection contre des conditions environnementales difficiles. Plusieurs souches appartenant à cette espèce ont été isolées dans des environnements radioactifs et étudiées pour leurs interactions avec l'uranium permettant l'immobilisation de celui-ci par libération d'orthophosphates par la cellule, réduction et adsorption.		
O19 LE -2 1 4	<i>Paenibacillus sp.</i> BF38 (AM934687)	3 Sauts			
O19 LE ND2 6	<i>Paenibacillus sp.</i> HA34 (KF011618)	3 Sauts			Ahmed et al., 2012 Grady et al., 2016 Reitz et al., 2014
O19 DO -1 3 7	<i>Paenibacillus sp.</i> strain zw2 (MH337929)	Dourieux			
O19 DO -1 3 14	<i>Sporosarcina sp.</i> H4BS7_pA (KX023562)	Dourieux	<i>Sporosarcina sp.</i> a déjà démontré sa capacité à adsorber des ions métalliques à sa surface grâce à sa couche S	Ryshkov et al., 2007	

S20 SAO -3 3 1	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i> strain EB335 (MH127787.1)	Salins	Certaines espèces de <i>Staphylococcus</i> peuvent résister à de fortes concentrations en uranium et l'adsorber à leur surface cellulaire	Zou et al., 2014
(Alpha)Proteobacteria				
O19 M1 -3 3 10	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain A223 (KC196495.1)	Montagne	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , bactérie fixatrice d'azote, a démontré une résistance à l'argent et à l'uranium	Tyupa et al., 2015
O19 LE -2 1 11	<i>Bosea</i> sp. RAC05 (CP016464)	3 Sauts	La souche <i>Bosea</i> sp. AS-1, isolé d'un échantillon de sol d'une mine d'antimoine (Chine), a démontré une forte résistance à l'arsenic (As) et l'antimoine (Sb), due à des gènes impliqués dans cette résistance.	Lu et al., 2018
S20 SAB -3 1 12	<i>Bosea</i> sp. strain MK25 (MN815880.1)	Salins		
S20 SAB -4 1 9				
O19 DO -1 2 14	<i>Brevundimonas</i> sp. 7-4 (AM900506)	Dourioux	Plusieurs souches apparentées à <i>Brevundimonas</i> sp. ont déjà été isolées dans des environnements contaminés en uranium	Fields et al., 2005 Islam et al., 2011 Sánchez-Castro et al., 2017
O19 B2 -1 3 4	<i>Brevundimonas</i> sp. strain 2954 (MT585929)	Bard		
O19 DO -3 1 5	<i>Brevundimonas</i> sp. strain B3P097 (MN989046)	Dourioux		
O19 MA -3 3 1	<i>Brevundimonas</i> sp. strain YPS3 (KY636447)	Mariol		
O19 M1 -2 2 17	<i>Caulobacter henricii</i> strain 20BR4A1 (MH482297.1)	Montagne		
O19 MA -1 1 4	<i>Caulobacter</i> sp. Is32 (KT267188)	Mariol	Des souches apparentées à <i>Caulobacter</i> sp. (<i>Caulobacter crescentus</i> et <i>Caulobacter</i> sp. strain OR37) ont démontré un fort potentiel pour être utilisées dans des applications de bioremédiation, en raison de leur capacité à minéraliser l'uranium (VI) dans des conditions aérobies, grâce à leur activité phosphatase	Morrison et al, 2021 Yung et al., 2014 Yung et Jiao, 2014
O19 MA -1 3 7				
O19 M1 -1 2 4	<i>Caulobacter</i> sp. strain DH29 (MK271766.1)	Montagne		
O19 DO -2 3 3	<i>Caulobacter vibrioides</i> strain 3 (MK602702)	Dourioux		
S20 SAB -2 1 8	<i>Novosphingobium</i> sp. strain ICMP 22288 (MH091571.1)	Salins		
S20 SAB -3 1 5				
S20 SAB -3 1 10				
S20 SAB -4 1 3				
O19 DO -3 1 7	<i>Phenylobacterium</i> sp. B2.34.2 (LR636337)	Dourioux	<i>Phenylobacterium</i> sp. a déjà été détectée dans des environnements contaminés en uranium et arsenic, démontrant sa capacité à supporter des contaminations multiples par des métaux et radioéléments	Islam et al., 2011 Lin et al., 2016
O19 DO -1 3 15				
S20 SAB -4 3 12	<i>Porphyrobacter</i> sp. TH01 (KT826493)	Salins	Des bactéries très proches de <i>Porphyrobacter</i> ont été détectées abondamment dans des bassins d'eaux de stockage de combustible	Ruiz-Lopez et al., 2020

			nucléaire, présentant des niveaux importants de radioactivité naturelle	
O19 LE -2 1 2	<i>Rhizobium jaguaris</i> strain NAC11 (MK872304)	3 Sauts	<i>Rhizobium sp.</i> a également été identifiée dans des environnements contaminés en uranium. De plus, cette souche a démontré un rôle essentiel dans la dénitrification d'aquifères co-contaminés en uranium et nitrates. En effet, les nitrates peuvent empêcher la réduction du U(VI) en entrant en compétition avec le U(VI) comme accepteur d'électrons.	Islam et Sar., 2016 Spain et Krumholz, 2012
O19 GR -1 2 16	<i>Rhizobium sp. strain</i> ICMP 22291 (MH392632)	Graviers		
O19 M1 -3 3 2	<i>Rhizobium sp. strain</i> py1134 (KX611611.1)	Montagne		
O19 GR -1 2 15 O19 GR -2 2 7	<i>Rhizobium sp. strain</i> SOT14 (MG547940)	Graviers		
S20 SAB -4 1 5	<i>Roseomonas sp. strain</i> 2R34 (MT278148.1)	Salins	Des gènes impliqués dans la résistance au cuivre, au cadmium, au plomb, à l'arsenic et au zinc ont été identifiés dans le génome de la souche <i>Roseomonas coralli sp. Nov</i> (M0104T)	Li et al., 2021
O19 LE -1 3 3	<i>Sphingobium xenophagum</i> strain OX0620 (MG576011)	3 Sauts	Les espèces associées à <i>Sphingobium sp.</i> ont démontré une forte tolérance à différents éléments traces métalliques présents dans l'environnement	Mahbub et al., 2016
O19 DO -1 1 20	<i>Sphingomonas sp. MP20</i> (AY521015.2)	Dourieux	<i>Sphingomonas sp.</i> a démontré un fort potentiel pour la biodégradation et la bioremédiation de sites contaminée en métaux et uranium.	Jaafar, 2019 Merroun et al., 2006
O19 DO -3 1 10	<i>Sphingomonas sp. NR 1-04</i> (KM253102)	Dourieux		
(Beta)Proteobacteria				
S20 SAB -3 1 11 S20 SAB -4 3 4	<i>Acidovorax facilis</i> strain CTM252 (MG550981.1)	Salins	<i>Acidovorax facilis</i> a démontré une capacité à interagir avec l'uranium par biosorption et bioaccumulation.	Gerber et al., 2016 Krawczyk-Bärsch et al., 2018
S20 SAB -3 3 5	<i>Acidovorax sp. strain</i> C12-8 (MT255180)	Salins	La souche S20 SAB -33 5, a montré une forte relation avec la bactérie <i>Acidovorax sp. strain</i> C12-8 qui a démontré une résistance aux éléments traces métalliques	Wu et al., 2020 (MT255180)
O19 M1 -2 2 18	<i>Collimonas sp. A9 1b-26a</i> (KF958483.1)	Montagne	<i>Collimonas sp. A9 1b-26a</i> , a été isolée à partir de sols provenant du site radioactif T22 de Tchernobyl (KF958483.1).	Chapon et al., 2012 (KF958483.1)
O19 M1 -2 2 2 O19 M1 -2 2 11	<i>Duganella sp. G3 16S</i> (KM588218.1)	Montagne	<i>Duganella sp.</i> a été étudiée pour sa tolérance multi-métallique. De plus, <i>Duganella sp.</i> est impliquée dans la formation d'oxydes de manganèse biogènes hautement réactifs, qui peuvent atténuer la contamination métallique par complexation avec les métaux.	Akob et al., 2014
O19 M1 -4 2 1b	<i>Duganella sp. HMD2171</i> (GQ354570.1)	Montagne		
O19 GR -1 2 11 O19 GR -2 2 2	<i>Hydrogenophaga crassostreae</i> strain LPB0072 (NR_158138)	Graviers	<i>Hydrogenophaga</i> favorise la bioréduction de l'uranium (VI) et du vanadium (V) dans des aquifères souterrains. De plus <i>Hydrogenophaga atypica</i> strain BDP10, isolée dans des aquifères	Chen et al., 2022 Ghosh et al., 2018

			contaminés en arsenic, a démontré la capacité à diminuer la disponibilité de l'arsenic	
O19 M1 -2 1 7 O19 DO -1 1 9	<i>Variovorax boronicumulans strain BF2-2</i> (MT078666)	Montagne Dourioux	<i>Variovorax sp.</i> a déjà été observées dans des environnements contaminés en uranium	Sánchez-Castro et al., 2017
(Gamma)Proteobacteria				
S20 SAO ND2 2	<i>Acinetobacter lwoffii strain k9</i> (HF584831)	Salins	La souche <i>Acinetobacter sp. YU-SS-SB-29</i> a été isolé d'un site à haut niveau de rayonnement naturel. De plus cette souche pouvait biominéraliser l'uranium (VI) qui précipite sous forme de minéral de phosphate d'uranyle	Sowmya et al., 2014
O19 GR -1 1 8	<i>Aeromonas sp. strain P14 1</i> (MT255092.1)	Graviers	<i>Aeromonas sp. strain P14-1</i> isolée et identifié dans des sédiments contaminés en éléments trace métalliques	
O19 GR ND1 7 O19 GR -1 1 5	<i>Aeromonas salmonicida strain CLS12</i> (KF478201.1)	Graviers	<i>Aeromonas salmonicida strain CLS12</i> isolée dans des sols contaminés en hydrocarbures	Wu et Sun., 2020 (MT255092.1) Fatima et Afzal., 2013 (KF478201.1) Shelobolina et al., 2009
O19 MA ND2 3	<i>Aeromonas sp. strain 280</i> (MF461115)	Mariol		
O19 GR -1 1 11	<i>Aeromonas salmonicida strain 13-1</i> (KR068565)	Graviers	<i>Aeromonas sp.</i> a permis l'élimination de U(VI) dans une eau souterraine artificielle contenant de fortes concentrations en uranium, par précipitation de minéraux de phosphate de calcium séquestrant l'uranium (VI)	
S20 SAB -1 1 3 S20 SAB -1 2 1	<i>Aeromonas salmonicida strain A1</i> (MT576565.1)	Salins		
O19 MA ND1 14	<i>Escherichia sp. strain GS39</i> (MH884047)	Mariol	<i>Escherichia coli</i> a déjà été étudiée et caractérisée génétiquement pour sa résistance à l'uranium ou pour sa capacité à interagir avec l'uranium par biosorption	Khemiri et al., 2014 Rong et al., 2016
O19 MA ND1 15 O19 MA -1 1 1	<i>Erwinia sp. strain A3K048b</i> (MN989056)	Mariol	<i>Erwinia sp.</i> a démontré qu'elle pouvait immobiliser l'uranium	Yuan et al., 2019
O19 MA ND1 2 O19 MA ND1 3 O19 MA ND1 4 O19 MA ND1 5	<i>Leclercia adecarboxylata strain L37</i> (KC934775)	Mariol	<i>Leclercia adecarboxylata</i> L1-5 (isolée d'un sol contaminé en éléments traces métalliques) est capable de solubiliser le phosphate dans l'environnement, et permet d'éliminer des métaux toxiques tel que le plomb	Yuan et al., 2022 Wang et al., 2022
O19 B2 -1 1 6	<i>Moraxella osloensis strain BMC3N2_24</i> (MH050412)	Bard	La famille <i>Moraxellaceae</i> était prédominante dans des eaux de puits contaminées en radon	Nayak et al., 2020
O19 DO -1 3 13	<i>Pseudomonas brenneri strain XJC-6</i> (MT631985)	Dourioux	Ces bactéries sont capables de coloniser un large éventail d'habitats et peuvent présenter une polyvalence nutritionnelle extrême. De plus <i>Pseudomonas sp.</i> sont communs dans des environnements contaminés en métaux/radionucléides.	Akob et al., 2008 Chabala et al., 2010 Chapon et al., 2012 Choudhary et Sar, 2009
O19 M1 -2 1 17	<i>Pseudomonas chlororaphis subsp. Aurantiaca</i> (MN865962.1)	Montagne		

O19 GR -1 2 8	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> strain <i>cqsV14</i> (MN826583)	Graviers			Choudhary et Sar, 2011a Choudhary et Sar, 2011b
O19 DO -1 2 6 O19 DO -1 2 9	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain <i>UTB_111</i> (MT624739)	Dourieux			Hu et al., 1996 Islam et Sar, 2011
O19 M1 ND2 1 O19 M1 -2 2 13	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> strain <i>DAC17225014</i> (LC516493.1)	Montagne			Kazy et al., 2008
O19 M1 -2 3 17	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> strain <i>QT-47</i> (MT065775.1)	Montagne			Merroun et Selenska-Pobell, 2008
O19 DO -1 2 16	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>ADAK 22</i> (CP052856.1)	Dourieux			Ruggiero et al., 2005
O19 M1 -1 2 9	<i>Pseudomonas jessenii</i> strain <i>AP3_16</i> (MF498772.1)	Montagne			
O19 GR -1 2 3	<i>Pseudomonas poae</i> strain <i>XJX-5</i> (MT631989)	Graviers			
O19 GR ND2 4 O19 GR -1 2 10	<i>Rheinheimera aquimaris</i> strain <i>PM02</i> (HM596592.1)	Graviers	<i>Rheinheimera aquimaris</i> strain <i>PM02</i> a été isolée dans des déchets de forage pollués par le pétrole		Abolhasani Soorki et al., 2010 (HM596592.1)
O19 B2 ND2 6 O19 M1 -1 1 8	<i>Shewanella</i> sp. <i>Iso-W8</i> (DQ677025)	Bard			Sheng et Fein, 2014
O19 GR ND1 2	<i>Shewanella</i> sp. strain <i>A16OP11</i> (CP046329)	Graviers	<i>Shewanella oneidensis</i> strain MR-1 a été étudiée et caractérisée pour sa capacité à adsorber l'uranium (VI), puis à le réduire sous forme d'uranium (IV)		Belli et al., 2015 Fredrickson et al., 2002
O19 M1 -1 1 10	<i>Shewanella putrefaciens</i> strain <i>FDAARGOS_681</i> (CP046329)	Montagne	<i>Shewanella putrefaciens</i> a été étudiée pour sa capacité à réduire l'uranium et le technétium		Lovley et al., 1991 Wildung et al., 2000
O19 GR -1 2 2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain <i>B24</i> (MN629066)	Graviers			
O19 GR ND2 2 O19 GR -2 2 3	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain <i>BaTD-109</i> (MT373663)	Graviers			
O19 GR -2 2 6	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain <i>LA-3</i> (MT631997)	Graviers	L'uranium était biominéralisé par <i>Stenotrophomonas</i> strain <i>BR8</i> (isolée dans des eaux porales de résidus miniers d'uranium) en raison de sa forte activité phosphatase, qui permettait la libération d'orthophosphate en présence de glycérol-2-phosphate.		Sánchez-Castro et al., 2020
O19 MA -2 3 2	<i>Tolomonas auensis</i> strain <i>CBA7530</i> (MN646993)	Mariol	<i>Tolomonas auensis</i> a été détectée dans l'étude de communautés microbiennes liées à la bioremédiation de l'uranium in situ		Akob et al., 2008
O19 B2 -1 1 10	<i>Xanthomonadaceae</i> bacterium <i>JCM 28276</i> (LC133623)	Bard			
O19 MA ND1 19 O19 MA ND2 12	<i>Xanthomonas</i> sp. strain <i>17B2</i> (MK456444)	Mariol	<i>Xanthomonas</i> a été détectée dans des puits d'eaux souterraines fortement contaminés en uranium (60mg/l) et était responsable de la réduction des nitrates dans ce site		Cho et al., 2011

III- Sélection de bactéries potentiellement radiorésistantes et interagissant avec l'uranium

La dernière partie de ce chapitre consiste à présélectionner certaines souches bactériennes parmi les souches isolées apparentées à des espèces bactériennes connues dans la littérature pour interagir avec l'uranium. En effet, étudier leurs mécanismes d'interactions avec l'uranium permettrait de mieux comprendre comment ces souches bactériennes se développent dans des environnements soumis à la radioactivité naturelle (NORM) ou naturelle renforcée (TENORM). Dans la littérature, plusieurs processus d'interaction entre des bactéries et l'uranium ont été décrits comme la réduction, l'absorption et l'accumulation par les cellules, la biosorption, la complexation avec des protéines, et la biominéralisation (Fashola et al., 2016 ; Kolhe et al., 2018; Lloyd, 2003 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008), et sont résumés dans la Figure 4 (Chapitre 1).

Comme décrit dans l'introduction de ce chapitre, pour le site de Rophin, les souches présélectionnées ne proviennent pas de la carotte de sol, mais de l'eau et des sédiments échantillonnées dans le ruisseau (Le Gourgeat) situé à l'aval de cet ancien site minier (Projet TREMPLIN décrit dans le deuxième chapitre). Néanmoins plusieurs souches isolées dans la carotte se sont révélées intéressante du fait qu'elles sont associées à des espèces bactériennes connues pour leur capacité à tolérer ou interagir avec l'uranium (Tableau 27). Le Tableau 14 ci-dessous synthétise les souches présélectionnées dans les sources minérales et le site de Rophin :

Tableau 14: Liste des souches bactériennes présélectionnées pour étude de leur résistance et interaction avec l'uranium

Label souche bactérienne	Environnement d'origine	Souche apparentée la plus proche (n° accession)	Mécanismes d'interaction avec l'uranium connus
<i>Actinobacteria</i>			
A17 N5 -1 2 5	Rophin – point n°5	<i>Arthrobacter sp. NW-2013-Rh11</i> (HG423549.1)	Biosorption, bioaccumulation, bioréduction
O19 B2 ND3 8	Source - Bard	<i>Arthrobacter sp. strain 810</i> (MT585987)	
A17 N1 ND1 11	Rophin – point n°1	<i>Cellulomonas sp. URHB0011</i> (LN876343.1)	Bioréduction, biominéralisation
O19 LE ND3 8	Source – 3 Sauts	<i>Microbacterium aurantiacum isolate K21-17</i> (LN650581)	Bioaccumulation, biominéralisation
O19 GR ND1 6	Source - Gravieres	<i>Microbacterium maritopicum strain P6F90</i> (MN421311.1)	
O19 M1 -1 2 11	Source - Montagne	<i>Microbacterium natoriense strain MLS-3-2</i> (KU204871.1)	
O19 LE -1 3 4	Source – 3 Sauts	<i>Microbacterium oxydans strain NR69-1</i> (MT533951)	
<i>Bacteroidetes</i>			
S20 SAB -3 2 6	Source – Salins	<i>Chryseobacterium sp. dR1-22</i> (HQ436418.1)	Biominéralisation
A17 11 -23	Rophin – point n°1	<i>Chryseobacterium sp. HWJ</i> (KJ959612.1)	
O19 GR ND1 4	Source - Gravieres	<i>Chryseobacterium sp. strain ICMP 22287</i> (MH392628.1)	
<i>Firmicutes</i>			
A17 34 -21	Rophin – point n°3	<i>Bacillus cereus Co1_1</i> (MH762120)	Biosorption, biominéralisation, bioréduction
A17 N5 ND2 1	Rophin – point n°5	<i>Bacillus cereus strain 261ZG12</i> (KF831382.1)	
A17 51 -38	Rophin – point n°5	<i>Bacillus cereus strain HDN-1</i> (MT271996.1)	

A17 11 -61a	Rophin – point n°1	<i>Bacillus thuringiensis strain CR2</i> (MN087809.1)	Biosorption, biominéralisation, bioréduction
A17 52 -52	Rophin – point n°5	<i>Bacillus thuringiensis strain EGI107</i> (MN704423.1)	
O19 LE ND1 4	Source – 3 Sauts	<i>Bacillus thuringiensis strain HER1410</i> (CP050183)	
O19 LE ND2 6	Source – 3 Sauts	<i>Paenibacillus sp. HA34</i> (KF011618)	Biosorption, biominéralisation, bioréduction
A17 N5 -1 1 3	Rophin – point n°5	<i>Paenibacillus terrae strain AM141</i> (NR_025170.1)	
(Alpha)Proteobacteria			
S20 SAB -3 1 6	Source - Salins	<i>Agrobacterium sp. MA01 chromosome</i> (CP045854.1)	-
O19 DO -2 1 20	Source - Dourieux	<i>Caulobacter sp. K935</i> (KM678278.1)	Biominéralisation
O19 M1 -1 2 4	Source - Montagne	<i>Caulobacter sp. strain DH29</i> (MK271766.1)	
(Beta)Proteobacteria			
S20 SAB -3 1 11	Source - Salins	<i>Acidovorax facilis strain CTM252</i> (MG550981.1)	Biosorption, bioaccumulation
O19 MA ND3 9	Source - Mariol	<i>Acidovorax sp. 1608163</i> (CP033069)	
O19 DO -1 2 1	Source - Dourieux	<i>Duganella sp. A1-587</i> (KF441573.1)	-
(Gamma)Proteobacteria			
S20 SAO ND2 3	Source - Salins	<i>Acinetobacter lwoffii strain k9</i> (MH125161)	Biominéralisation
S20 SAB -1 1 3	Source - Salins	<i>Aeromonas salmonicida strain A1</i> (MT576565.1)	Biominéralisation
O19 M1 -2 2 13	Source - Montagne	<i>Pseudomonas frederiksbergensis DAC17225014</i> (LC516493.1)	Biosorption, bioréduction, biominéralisation, bioaccumulation
A17 N3 -1 2 4	Rophin – point n°3	<i>Pseudomonas frederiksbergensis strain BGN3_6_6</i> (MN197580.1)	

O19 M1 -1 3 8	Source - Montagne	<i>Pseudomonas jessenii</i> strain AP3_16 (MF498772.1)	Biosorption, bioréduction, biominéralisation, bioaccumulation
A17 N3 ND1 16	Rophin – point n°3	<i>Pseudomonas jessenii</i> strain AP3_16 (MF498772.1)	
O19 DO -1 2 16	Source - Dourieux	<i>Pseudomonas sp ADAK22</i> (CP052856.1)	
A17 51 -24	Rophin – point n°5	<i>Pseudomonas sp. F17</i> (GU120660.1)	Biosorption, bioréduction, biominéralisation, bioaccumulation
A17 N1 ND1 2	Rophin – point n°1	<i>Pseudomonas veronii</i> strain Pvy (NZ_CP039631.3)	
A17 12 -22	Rophin – point n°1	<i>Serratia fonticola</i> strain N36-2-3-2 (MN696514.1)	
O19 M1 -1 1 10	Source - Montagne	<i>Shewanella putrefaciens</i> strain FDAARGOS_681 (CP046329)	Bioréduction, biosorption
O19 B2 ND2 6	Source - Bard	<i>Shewanella sp. Iso-W8</i> (DQ677025)	
O19 GR ND1 2	Source - Gravieres	<i>Shewanella sp. strain A16OP11</i> (CP046329.1)	
O19 GR ND2 2	Source - Gravieres	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain BaTD-109 (MT373663.1)	
A17 33 -25	Rophin – point n°3	<i>Stenotrophomonas sp EC-HK413</i> (LT934167.1)	Biominéralisation
O19 MA ND1 11	Source - Mariol	<i>Uncultured bacterium clone 26B1-F12</i> (FN813993)	-

Au total 40 souches bactériennes ont été sélectionnées, dont 25 souches bactériennes isolées à partir des sources minérales et 15 souches bactériennes provenant du ruisseau situé à l'aval de l'ancien site minier de Rophin. L'arbre phylogénétique ci-dessous permet de classer ces souches bactériennes en fonction de leur similarité génétique (Figure 55).

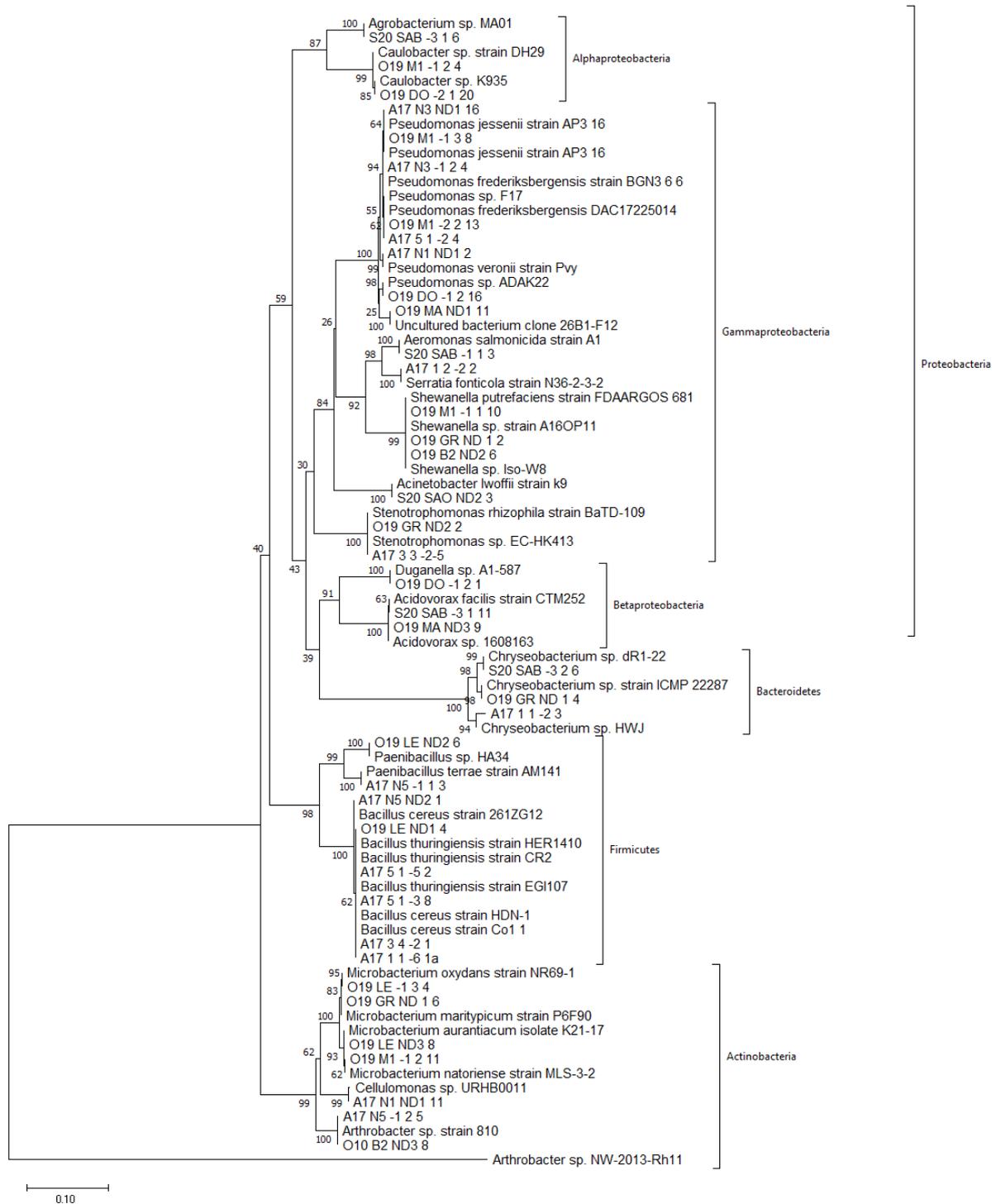


Figure 55: Arbre phylogénétique des souches présélectionnées pour étudier leur résistance et interaction avec l'uranium

Parmi le phylum des *Actinobacteria* nous avons deux souches étaient associées à l'espèce *Arthrobacter sp.* (Tableau 14) pour leur capacité à tolérer et interagir avec plusieurs métaux/radioéléments (Cr, Cs, Sr, Hg, Pb, Cu, Cd, U, Th) (Benyehuda et al., 2003 ; Hanbo et al., 2004 ; Martinez et al., 2006 ; Nakajima et Tsuruta, 2004 ; Pathak et al., 2020 ; Suzuki et Banfield, 2004), via différents mécanismes tels que la bioréduction (Xiao et al., 2017), bioaccumulation (Suzuki et Banfield, 2004) ou biosorption (Hlihor et al., 2017 ; Nakajima et Tsuruta, 2004 ; Swer et al., 2016).

Parmi l'embranchement des *Actinobacteria*, 4 souches sélectionnées appartenait au genre *Microbacterium* (Tableau 14) car ce genre a déjà été détecté dans des environnements radioactifs démontrant sa capacité à se développer dans des conditions stressantes (Chapon et al., 2012 ; Islam et Sar., 2016 ; Nedelkova et al., 2007 ; Sánchez-Castro et al., 2017 ; Theodorakopoulos et al., 2015). En effet, les populations de *Microbacterium* sont connues pour être flexibles, capables de s'adapter rapidement à des conditions de stress et peuvent supporter la présence de métaux, dont des radioéléments, dans leurs habitats (Lopez-Fernandez et al., 2021 ; Nedelkova et al., 2007). De plus, plusieurs membres de l'espèce *Microbacterium oxydans*, à laquelle la souche O19 LE -13 4 est associée, ont démontré son aptitude à accumuler de grandes quantités d'uranium, à la fois sous forme intracellulaire, à la surface de leurs cellules, et sous forme extracellulaire de phosphate d'uranium (Nedelkova et al., 2007 ; Sánchez-Castro et al., 2017). D'autres espèces de *Microbacterium*, tel que *Microbacterium oleivorans A9* isolée d'un échantillon de sol de Tchernobyl, ont démontré une tolérance/survie à de fortes concentrations en uranium potentiellement grâce à un mécanisme actif favorisant l'efflux du métal de la cellule, ainsi que l'accumulation intracellulaire sous forme de minéraux (autunite) (Gallois et al., 2018 ; Theodorakopoulos et al., 2015). Enfin, la dernière souche sélectionnée appartenant au phylum des *Actinobacteria* est associée à *Cellulomonas sp.*, (Tableau 14) dont plusieurs souches bactériennes appartenant à cette espèce ont été étudiées pour leur capacité à éliminer l'uranium (VI) et le chrome (VI) d'une solution par réduction dans des conditions anaérobies (Sani et al., 2002). Notamment, Sivaswamy et al., 2010 ont étudié l'élimination de l'uranium (VI) par la souche *Cellulomonas sp. strain ES6* dans des conditions anaérobies. Cette souche était capable à la fois de libérer du phosphate inorganique, fournissant des ligands pour la formation de précipités d'uranyl-phosphate, mais également de réduire U(VI) en U(IV) (forme insoluble) (Sivaswamy et al., 2010).

Dans l'embranchement des *Bacteroidetes*, trois souches appartenant à l'espèce *Chryseobacterium sp.*, ont été sélectionnées (Tableau 14). Une souche bactérienne appartenant à cette espèce bactérienne (*Chryseobacterium sp. strain PMSZPI* isolée d'un sol de gisement d'uranium) a été étudiée pour ses propriétés de tolérance multi-métallique, dont l'uranium, dû à la présence de gènes associés à cette résistance (système d'efflux de métaux, transporteurs, phosphatase, réparation de l'ADN, défense contre le stress oxydatif) (Khare et al., 2020 ; Nongkhlaw et Joshi, 2019). De plus, cette souche est capable de bioprécipiter l'uranium grâce à son activité phosphatase, sur une large gamme de pH (de 5 à 9), démontrant son intérêt dans un contexte de bioremédiation (Khare et al., 2020).

Pour l'embranchement des *Firmicutes*, 8 souches bactériennes ont été présélectionnées, dont 6 souches associées à l'espèce bactérienne *Bacillus sp.*, et 2 souches apparentées à *Paenibacillus sp.* (Tableau 14). Ces deux espèces peuvent former des spores, des structures cellulaires qui offrent une protection importante contre les conditions environnementales difficiles (Grady et al., 2016 ; Nicholson, 2002). Parmi les souches associées à *Bacillus sp.*, trois souches sont apparentées à *Bacillus cereus* et trois autres souches sont associées à *Bacillus thuringiensis*. Des souches associées à ces deux espèces, dont *Bacillus cereus 12-2* (isolée d'un site contaminé par le plomb et le zinc), *Bacillus thuringiensis strain BRC-ZYR3* et *BRC-ZYR4* (isolées d'une mine d'uranium en Chine) et *Bacillus thuringiensis O16*, ont démontré une capacité à interagir avec l'uranium (Pan et al., 2015 ; Wei et al., 2019 ; Zhang et al., 2018) par biosorption extracellulaire de l'uranium, et pénétration des précipités d'uranium dans la cellule puis biominéralisation intracellulaire (uramphite) (Pan et al., 2015 ; Wei et al., 2019 ; Zhang et al., 2018). La biosorption de l'uranium était liée à un processus non-enzymatique dans lequel les groupes phosphate, amino et carboxyle jouaient un rôle majeur. D'autre part, la biominéralisation intracellulaire de l'uranium était liée à un effet synergique d'enzymes et métabolismes cellulaires, dont une activité phosphatase permettant la libération de phosphates se complexant avec l'uranium pour former de l'uramphite (forme cristalline insoluble). Cette co-interaction de ces souches bactériennes avec l'uranium leur permet par conséquent d'immobiliser efficacement celui-ci dans l'environnement, réduisant donc sa biodisponibilité pour les autres organismes (Pan et al., 2015 ; Wei et al., 2019 ; Zhang et al., 2018).

Le phylum des *Proteobacteria* est représenté par 22 souches bactériennes présélectionnées, avec 3 souches appartenant à la classe *Alphaproteobacteria*, 3 souches appartenant à la classe *Betaproteobacteria* et 16 souches appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria* (Tableau 14).

Les isolats sélectionnés, appartenant aux *Alphaproteobacteria*, sont liés à *Agrobacterium sp.* (S20 SAB -31 6) et *Caulobacter sp.* (O19 DO -21 20 et O19 M1 -12 4), déjà observés dans des environnements radioactifs et capables de tolérer de fortes concentrations d'uranium (Brzoska et Bollman, 2016 ; Morrison et al., 2021 ; Tyupa et al., 2015). Des souches apparentées à *Caulobacter sp.* (*Caulobacter crescentus* et *Caulobacter sp.* strain OR37) ont démontré un fort potentiel pour être utilisées dans des applications de bioremédiation, en raison de leur capacité à minéraliser l'uranium (VI) dans des conditions aérobies, grâce à leur activité phosphatase (Morrison et al, 2021 ; Yung et al., 2014 ; Yung et Jiao, 2014).

La classe des *Betaproteobacteria* est représentée par des souches bactériennes associées à *Acidovorax sp.* (O19 MA ND3 9), *Acidovorax facilis* (S20 SAB -31 11) et *Duganella sp.* (O19 DO -12 1). *Acidovorax facilis*, distribuée de manière ubiquitaire dans la nature, y compris dans des sites contaminés en uranium, a démontré dans des études antérieures, une capacité à interagir avec l'uranium par biosorption et bioaccumulation (Gerber et al., 2016 ; Krawczyk-Bärsch et al., 2018). L'uranium était principalement lié aux groupes phosphates des lipopolysaccharides de la membrane externe de cette bactérie (Krawczyk-Bärsch et al., 2018). En outre, la souche O19 DO -12 1 a été sélectionnée car le plus proche parent de cette souche, affiliée à *Duganella sp. AI-587*, a été isolé à partir d'échantillons provenant d'environnement contaminé en uranium de la mine d'Urgeirica (Portugal) (KF441573.1).

Enfin, les souches sélectionnées, appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria*, sont majoritairement associées au genre *Pseudomonas* : *Pseudomonas frederiksbergensis* (O19 M1 -22 13 et A17 N3 -12 4), *Pseudomonas jessenii* (O19 M1 -1 3 8 et A17 N3 ND1 16), *Pseudomonas sp.* (O19 DO -12 16 et A17 51 -24), *Pseudomonas veronii* (A17 N1 ND1 1) et *Uncultured bacterium* (O19 MA ND1 11) dont le parent le plus proche appartient également au genre *Pseudomonas* (Tableau 14). *Pseudomonas sp.* sont communs dans des environnements contaminés en métaux/radionucléides (Akob et al., 2008 ; Chapon et al., 2012 ; Islam et Sar, 2011). Enfin, des espèces résistantes aux métaux/radionucléides et qui ont la capacité d'interagir avec ceux-ci ont également été décrites (Kazy et al., 2008 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008 ; Ruggiero et al., 2005). Par exemple, *Pseudomonas stutzeri* a été décrite pour sa capacité à réduire U(VI) (Chabala et al., 2010), alors que *Pseudomonas aeruginosa* possède la capacité d'accumuler (Choudhary et Sar, 2011a), biominéraliser (Choudhary et Sar, 2011b) et biosorber (Hu et al., 1996) l'uranium. De plus, *Pseudomonas fluorescens* a été caractérisée pour son application potentielle dans la bioremédiation des métaux (Ni, Co, Cu et Cd) (Choudhary et Sar, 2009).

De plus, parmi les Gammaproteobacteria, des souches bactériennes appartenant à *Serratia fonticola* (A17 12 -22), *Shewanella putrefaciens* (O19 M1 -11 10), *Shewanella sp.* (O19 B2 ND2 6 et O19 GR ND1 2), *Stenotrophomonas sp.* (A17 33 -25 et O19 GR ND2 2), *Aeromonas salmonicida* (S20 SAB -1 1 3) et *Acinetobacter lwoffii* (S20 SAO ND2 3) ont été sélectionnées (Tableau 14). Des bactéries appartenant à ces différentes espèces ont déjà été étudiées pour leurs interactions avec l'uranium :

- Plusieurs souches apparentées à *Serratia sp.* ont démontré une résistance accrue aux métaux et radioéléments, tels que l'uranium, le cuivre, le cadmium, le zinc et le plomb (Kumar et al., 2011 ; Sarma et al., 2013). De plus ces souches pouvaient interagir avec l'uranium (VI) et l'éliminer efficacement en solution. En particulier *Serratia sp. strain OTII 7* (isolée du gisement d'uranium de Domiasiat (Inde)) (Chandwadkar et al., 2018) et *Serratia sp.* (isolée du site nucléaire de Sellafield (Royaume Uni)) (Newsome et al., 2015) ont été étudiées pour leur capacité à biominéraliser l'uranium en présence d'une source de phosphate dans le milieu (β -glycérophosphate). Cette précipitation est possible grâce à des enzymes phosphatases permettant la libération de phosphates, à partir de l'hydrolyse du substrat organophosphoré, qui vont se complexer avec l'uranium et former des cristaux de phosphate d'uranium insolubles (Chandwadkar et al., 2018 ; Newsome et al., 2015).
- *Shewanella oneidensis* strain MR-1 a été étudiée et caractérisée pour sa capacité à adsorber l'uranium (VI), puis à le réduire sous forme (IV) (Sheng et Fein, 2014). La Figure 56 ci-dessous, proposée par les auteurs, décrit le mécanisme d'interaction entre l'uranium et la souche *S. oneidensis*. Pour cette souche, la spéciation et la concentration de l'U(VI) adsorbé sur l'enveloppe cellulaire bactérienne contrôlaient la cinétique de bioréduction de l'U(VI).

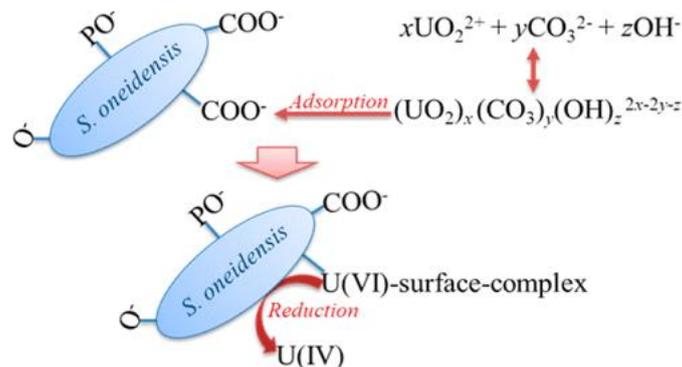


Figure 56: Mécanisme d'interaction entre l'uranium et la souche *Shewanella oneidensis* strain MR-1 (Shen et Fein, 2014)

Par ailleurs, des souches bactériennes, associées à *Shewanella putrefaciens*, ont déjà démontré leur capacité à réduire l'uranium et le technétium de leurs formes solubles en une forme insoluble qui va précipiter dans l'environnement. (Belli et al., 2015 ; Fredrickson et al., 2002 ; Lovley et al., 1991 ; Wildung et al., 2000).

- La souche *Stenotrophomonas strain BR8*, isolée dans des eaux porales de résidus miniers d'uranium, biominéralise l'uranium, grâce à une activité phosphatase élevée qui a permis la libération d'orthophosphate en présence de glycérol-2-phosphate (Sánchez-Castro et al., 2020). Les ions uranyles mobiles se sont complexés aux orthophosphates pour former un complexe insoluble (proche de la méta-autunite), qui bioprécipite à la surface des cellules dans l'espace extracellulaire (Sánchez-Castro et al., 2020).
- *Aeromonas sp.* est responsable de l'hydrolyse du glycérol-3-phosphate dans une eau souterraine artificielle contenant de fortes concentrations en uranium. Cette libération de phosphate a permis l'élimination de U(VI) par précipitation de minéraux de phosphate de calcium séquestrant l'uranium (VI) (Shelobolina et al., 2009).
- Au même degré, la souche *Acinetobacter sp. YU-SS-SB-29*, isolée d'un site à haut niveau de rayonnement naturel, a solubilisé des orthophosphates (à partir du phosphate tricalcique) se complexant avec l'uranium (VI) qui va précipiter sous forme de minéral de phosphate d'uranyle (Sowmya et al., 2014).

IV- Résistance des souches bactériennes à l'uranium

1) Solubilité de l'uranium dans le milieu de culture utilisé pour ces expériences

Dans le cadre des expériences d'interaction entre bactéries et uranium, le choix du milieu de culture est une étape importante. En effet, il faut à la fois trouver un milieu de culture où l'uranium est soluble et qui permette la croissance des bactéries étudiées. Généralement, les milieux de culture sont composés d'éléments minéraux (principalement des sels) et organiques

(sucre, acide aminés) essentiels pour la croissance des bactéries. L'ion uranyle étant une molécule très réactive, de nombreux complexes peuvent se former entre les éléments du milieu de culture et l'uranium, entraînant une précipitation abiotique de ce dernier. De plus, des solutions tampons sont souvent ajoutées aux milieux de culture pour fixer le pH de celui-ci. L'ajout d'uranium dans une solution tamponnée peut également conduire à la précipitation de celui-ci en fonction du pH du milieu de culture. Il est donc judicieux de sélectionner un milieu de culture où l'uranium reste soluble pendant toute la durée d'exposition des bactéries à l'uranium. Après avoir testée la solubilité de l'uranium dans plusieurs milieux de culture, le milieu « Freshwater Minimal Medium » (FMM) a été sélectionné (composition en Annexe 1). Ce milieu minimal a été utilisé par Newsome et al., 2015 pour étudier la biominéralisation et la bioréduction de l'uranium par une souche bactérienne (*Serratia*). Les auteurs avaient utilisé deux sources de phosphate différentes, le β -glycérophosphate et le sodium trimetaphosphate, permettant de limiter la précipitation abiotique de l'uranium due à l'hydrolyse abiotique de la source de phosphate dans le milieu. Dans le cadre de nos expériences, la solubilité de l'uranium a été testée dans le milieu FMM pour ces deux sources de phosphate.

Pour tester la résistance des souches bactériennes étudiées à l'uranium, leur croissance en présence de 100 μ M d'uranium a été suivie sur 3 jours à pH 7. Cette concentration en uranium a été choisie en raison d'autres études montrant que cette concentration d'uranium avait un effet sur la croissance bactérienne sans l'inhiber complètement (Khemiri et al., 2014 ; Pinel-Cabello et al., 2021 ; Rogiers et al., 2022 ; Suzuki et Banfield, 2004 ; Theodorakopoulos et al., 2015). De ce fait, la concentration en uranium dans le milieu FMM contenant 100 μ M de nitrate d'uranyle à pH 7 a été mesurée après 4 jours par mesure spectrophotométrique utilisant la méthode colorimétrique « Bromo-Padap » (Johnson et Florence, 1971). Les mesures de concentrations d'uranium dans le milieu FMM après 4 jours sont données dans le Tableau 15 ci-dessous :

Tableau 15 : Concentrations d'uranium mesurées après 4 jours dans les milieux FMM + β -glycérophosphate et FMM + sodium trimetaphosphate contenant 100, 500 ou 1000 μ M de nitrate d'uranyle

Solution	Concentration uranium mesurée (μM) à 4 jours
FMM + β-glycérophosphate + 100μM U à pH 7	94,1 \pm 10,0
FMM + sodium trimetaphosphate + 100μM U à pH 7	113 \pm 0,4

Le milieu FMM, pour les deux sources de phosphate utilisées, n'a montré aucune précipitation d'uranium au bout de 4 jours. De plus les concentrations mesurées sur 4 jours dans les deux milieux sont très proches de la concentration théorique initialement introduite. Ces résultats démontrent par conséquent que l'uranium reste soluble dans le milieu de culture FMM, pour les deux sources de phosphate, à pH 7 sur une durée de 4 jours.

2) Sélection des souches mises en présence d'uranium

Afin de tester la résistance des souches bactériennes à l'uranium, les 40 souches présélectionnées ont été au préalable mises en culture dans le milieu de culture « Freshwater Minimal Medium » (FMM) sans uranium afin de sélectionner les souches capables de croître dans ce milieu de culture. La croissance des souches a été testée avec les deux sources de phosphate différentes, dont un organophosphate avec du β -glycérophosphate (FMM 1), et un métaphosphate avec du Trimetaphosphate (FMM 2). Les souches bactériennes ont été mises en culture à 30°C entre 48 et 72h sous agitation. La croissance des bactéries a été suivie par mesure de la densité optique (DO) à 600nm toutes les heures. Chaque condition a été réalisée en triplicata. Le Tableau 16 ci-dessous récapitule la croissance observée de chaque souche dans les 2 milieux de culture selon un code couleur : Vert = croissance ; Jaune = faible croissance ; Rouge = pas de croissance.

Pour 16 souches bactériennes, aucune croissance a été observée après 72 heures de culture. De plus, pour 7 souches bactériennes, la croissance était très faible dans les 2 milieux de culture testés. Au total, seules 17 souches bactériennes ont montré une croissance dans le milieu de culture FMM après 72h d'incubation. Ces souches ont été sélectionnées pour tester leur résistance et leur croissance en présence d'uranium.

Tableau 16: Croissance des souches bactériennes préselectionnées dans les milieux FMM + β -glycérophosphate et FMM + Trimetaphosphate. Vert = Croissance, Jaune = Faible croissance, Rouge = pas de croissance

Souche	Affiliation	Croissance	
		FMM + β -glycérophosphate	FMM + Trimetaphosphate
S20 SAB -3 1 11	<i>Acidovorax facilis</i> strain CTM252	Vert	Vert
O19 MA ND3 9	<i>Acidovorax</i> sp. 1608163	Vert	Vert
S20 SAO ND2 3	<i>Acinetobacter lwoffii</i> strain k9	Rouge	Vert
S20 SAB -1 1 3	<i>Aeromonas salmonicida</i> strain A1	Vert	Vert
S20 SAB -3 1 6	<i>Agrobacterium</i> sp. MA01 chromosome	Rouge	Rouge
A17 N5 -1 2 5	<i>Arthrobacter</i> sp. NW-2013-Rh11	Vert	Vert
O19 B2 ND3 8	<i>Arthrobacter</i> sp. strain 810	Vert	Vert
A17 34 -21	<i>Bacillus cereus</i> Co1_1	Rouge	Rouge
A17 N5 ND2 1	<i>Bacillus cereus</i> strain 261ZG12	Jaune	Jaune
A17 51 -38	<i>Bacillus cereus</i> strain HDN-1	Rouge	Rouge
A17 11 -61a	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain CR2	Jaune	Jaune
A17 52 -52	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain EGI107	Rouge	Rouge
O19 LE ND1 4	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HER1410	Jaune	Jaune
O19 DO -1 2 1	<i>Bacterium</i> C7(2009)	Jaune	Jaune
O19 DO -2 1 20	<i>Caulobacter</i> sp. K935	Rouge	Rouge
O19 M1 -1 2 4	<i>Caulobacter</i> sp. strain DH29	Rouge	Rouge
A17 N1 ND1 11	<i>Cellulomonas</i> sp. URHB0011	Rouge	Rouge
S20 SAB -3 2 6	<i>Chryseobacterium</i> sp. dR1-22	Rouge	Rouge
A17 11 -23	<i>Chryseobacterium</i> sp. HWJ	Rouge	Rouge
O19 GR ND1 4	<i>Chryseobacterium</i> sp. strain ICMP 22287	Rouge	Rouge
O19 LE ND3 8	<i>Microbacterium aurantiacum</i> isolate K21-17	Jaune	Jaune
O19 GR ND1 6	<i>Microbacterium maritypicum</i> strain P6F90	Jaune	Jaune
O19 M1 -1 2 11	<i>Microbacterium natoriense</i> strain MLS-3-2	Vert	Rouge
O19 LE -1 3 4	<i>Microbacterium oxydans</i> strain NR69-1	Rouge	Rouge
O19 LE ND2 6	<i>Paenibacillus</i> sp. HA34	Rouge	Rouge
A17 N5 -1 1 3	<i>Paenibacillus terrae</i> strain AM141	Rouge	Rouge
O19 M1 -2 2 13	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> DAC17225014	Vert	Vert
A17 N3 -1 2 4	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> strain BGN3_6_6	Vert	Vert
O19 M1 -1 3 8	<i>Pseudomonas jessenii</i> strain AP3_16	Jaune	Jaune
A17 N3 ND1 16	<i>Pseudomonas jessenii</i> strain AP3_16	Vert	Vert
O19 DO -1 2 16	<i>Pseudomonas</i> sp ADAK22	Vert	Vert
A17 51 -24	<i>Pseudomonas</i> sp. F17	Vert	Vert
A17 N1 ND1 1	<i>Pseudomonas veronii</i> strain Pvy chromosome	Rouge	Rouge
A17 12 -22	<i>Serratia fonticola</i> strain N36-2-3-2	Vert	Vert
O19 M1 -1 1 10	<i>Shewanella putrefaciens</i> strain FDAARGOS_681	Vert	Vert
O19 B2 ND2 6	<i>Shewanella</i> sp. Iso-W8	Vert	Vert
O19 GR ND1 2	<i>Shewanella</i> sp. strain A16OP11	Vert	Vert
O19 GR ND2 2	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain BaTD-109	Rouge	Rouge
A17 33 -25	<i>Stenotrophomonas</i> sp EC-HK413	Rouge	Rouge
O19 MA ND1 11	Uncultured bacterium clone 26B1-F12	Vert	Vert

3) Croissance des souches bactériennes en présence d'uranium

Afin d'observer la capacité de ces souches bactériennes à croître en présence d'uranium et à le tolérer, les 17 souches bactériennes ont été mises en culture dans les deux milieux FMM (FMM 1 et FMM 2), en présence de 100 μM de nitrate d'uranyle pendant 70 heures à 30°C à une DO initiale de 0,02. L'objectif principal de cette expérience est de sélectionner des souches bactériennes qui ont le potentiel de se développer en présence d'uranium et d'interagir avec celui-ci afin de déterminer quelles sont les mécanismes d'interactions entre ces bactéries et l'uranium. Trois critères ont été pris en compte pour sélectionner les souches bactériennes :

- Est-ce que la présence d'uranium affecte la croissance de la souche bactérienne ?
- Quelle souche bactérienne croît le plus rapidement en présence d'uranium ?
- Quelle souche élimine le plus d'uranium dans la phase soluble ?

Pour répondre au 1^{er} critère, pour déterminer si la présence d'uranium a impacté la croissance d'une souche bactérienne, des tests de comparaison des moyennes (t-test) des taux de croissance (r) en absence et présence d'uranium ont été réalisés

Ensuite pour répondre au 2^{ème} critère, le taux de croissance (r) en présence d'uranium pour chaque souche bactérienne a été calculé à partir des courbes de croissance obtenues à l'aide du package Growthcurver du logiciel R studio. Les taux de croissance moyens obtenus dans les deux milieux pour chaque souche sont présentés sur la Figure 57 ci-dessous.

Enfin, afin d'observer quelles souches bactériennes éliminent le plus d'uranium dans la phase soluble, la concentration en uranium dans le milieu de culture a été mesurée après 30 jours de mise en contact entre l'uranium et les cellules bactériennes. Le pourcentage d'élimination d'uranium a été déterminé par rapport au contrôle pour chacune des souches étudiées (Figure 58).

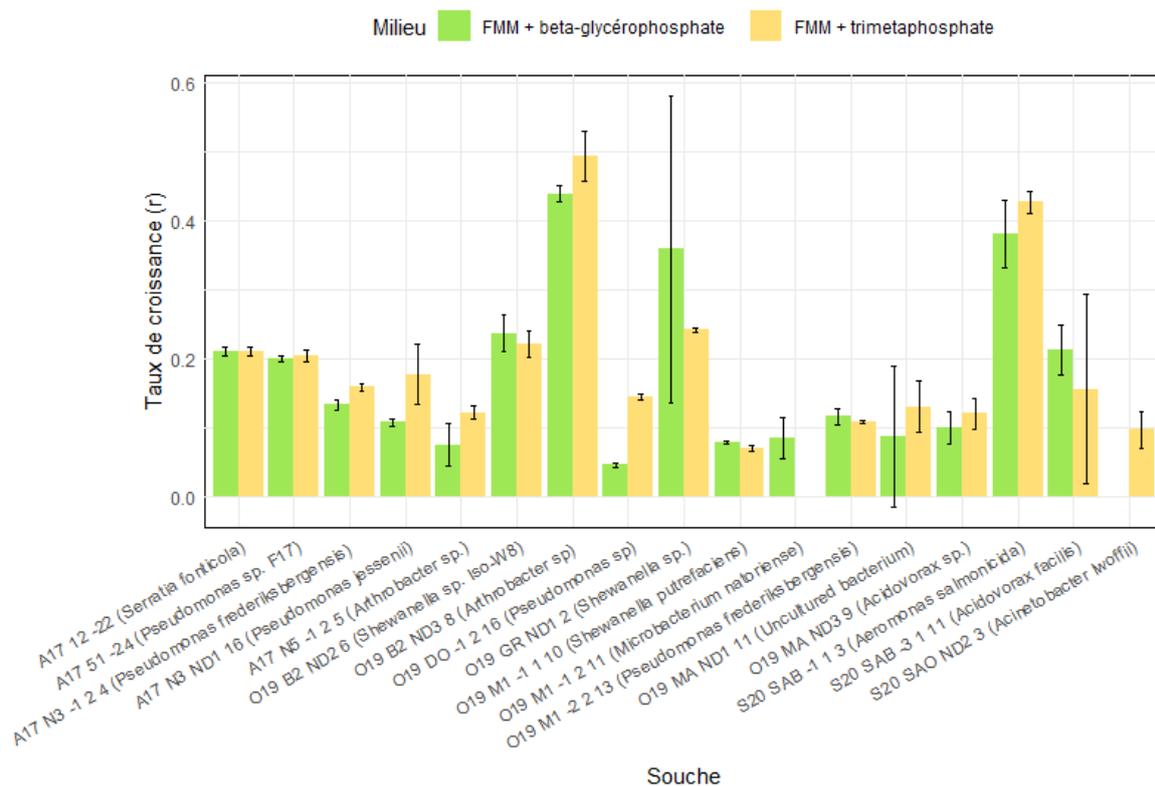


Figure 57 : Taux de croissance des différentes souches étudiées dans chaque milieu de culture (FMM + β -glycérophosphate et (FMM + trimetaphosphate) en présence de 100 μ M de nitrate d'uranyle après 70 heures d'incubation à 30°C

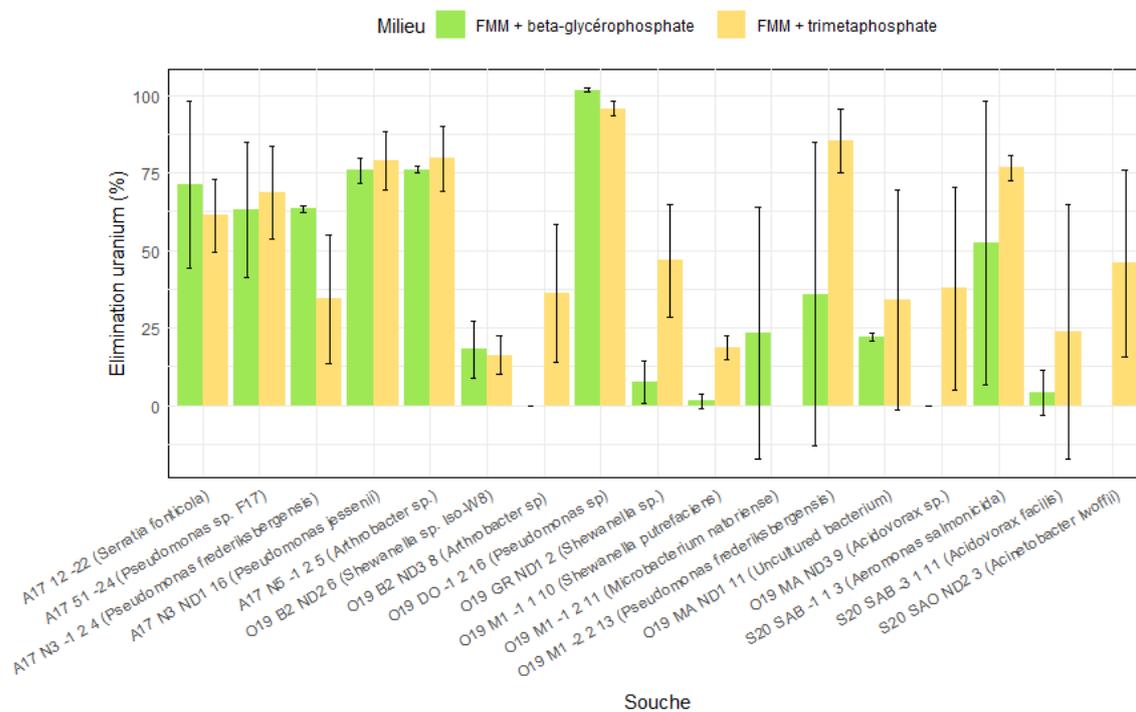


Figure 58: Pourcentage d'élimination de l'uranium dans les milieux de culture (FMM + β -glycérophosphate et FMM + trimetaphosphate) par les différentes souches bactériennes après 30 jours de culture dans les 2 milieux

Les résultats obtenus pour répondre à ces trois critères sont résumés dans le Tableau 17 (souches isolées à partir du site de Rophin) et le Tableau 18 (souches isolées à partir des sources minérales) ci-dessous. Tout d'abord, les différences significatives obtenues par comparaison des moyennes du taux de croissance en présence ou absence d'uranium (t-test) sont indiquées par un * si $p < 0,05$, ** si $p < 0,005$ et *** si $p < 0.0005$. Ensuite, la capacité d'une souche bactérienne à croître rapidement en présence d'uranium, par rapport aux autres souches étudiées, a été défini comme suit : + = de la valeur minimale de r au 1^{er} quartile ; ++ = du 1^{er} quartile à la médiane ; +++ = de la médiane au 3^{ème} quartile ; ++++ = du 3^{ème} quartile à la valeur maximale de r. Enfin, le potentiel d'élimination d'une souche bactérienne a été défini comme suit : + = élimination entre 0 et 25% ; ++ = élimination entre 25 et 50% ; +++ = élimination entre 50 et 75% ; et ++++ = élimination entre 75 et 100%. Ces tableaux récapitulatifs permettront de mieux discerner quelles souches sélectionner pour les études d'interaction bactéries – uranium selon les critères définis.

Tableau 17: Tableau récapitulatif résumant les résultats obtenus pour les souches isolées du site de Rophin

Souches	Différence taux de croissance avec et sans U		Taux de croissance avec U		Elimination U	
	FMM 1	FMM 2	FMM 1	FMM 2	FMM 1	FMM 2
A17 12 -22 (<i>Serratia fonticola</i>)	***	***	+++	+++	+++	+++
A17 51 -24 (<i>Pseudomonas sp. F17</i>)	**	**	+++	+++	+++	+++
A17 N3 -1 2 4 (<i>Pseudomonas frederiksbergensis strain BGN3_6_6</i>)	ns	ns	++	+++	+++	++
A17 N3 ND1 16 (<i>Pseudomonas jessenii strain AP3_16</i>)	ns	ns	++	+++	++++	++++
A17 N5 -1 2 5 (<i>Arthrobacter sp. NW-2013-Rh11</i>)	ns	ns	+	++	++++	++++

Tableau 18: Tableau récapitulatif résumant les résultats obtenus pour les souches isolées des sources minérales naturellement radioactives

Souches	Différence taux de croissance avec et sans U		Taux de croissance avec U		Elimination U	
	FMM 1	FMM 2	FMM 1	FMM 2	FMM 1	FMM 2
O19 B2 ND2 6 (<i>Shewanella sp. Iso-W8</i>)	ns	ns	++++	++++	+	+
O19 B2 ND3 8 (<i>Arthrobacter sp. strain 810</i>)	ns	ns	++++	++++	+	++
O19 DO -1 2 16 (<i>Pseudomonas sp ADAK22</i>)	ns	***	+	++	++++	++++
O19 GR ND1 2 (<i>Shewanella sp. strain A16OP11</i>)	ns	ns	++++	++++	+	++
O19 M1 -1 1 10 (<i>Shewanella putrefaciens strain FDAARGOS_681</i>)	*	**	+	+	+	+
O19 M1 -1 2 11 (<i>Microbacterium natoriense strain MLS-3-2</i>)	ns	/	+	/	+	/
O19 M1 -2 2 13 (<i>Pseudomonas frederiksbergensis DAC17225014</i>)	ns	ns	++	++	++	++++
O19 MA ND1 11 (<i>Uncultured bacterium clone 26B1-F12</i>)	ns	ns	+	++	+	++
O19 MA ND3 9 (<i>Acidovorax sp. 1608163</i>)	ns	ns	+	++	+	++
S20 SAB -1 1 3 (<i>Aeromonas salmonicida strain A1</i>)	ns	ns	++++	++++	+++	++++
S20 SAB -3 1 11 (<i>Acidovorax facilis strain CTM252</i>)	ns	ns	+++	+++	+	+
S20 SAO ND2 3 (<i>Acinetobacter lwoffii strain k9</i>)	/	ns	/	+	/	++

Parmi les souches isolées à partir des échantillons des sources minérales radioactives (Tableau 18) et du ruisseau à l'aval de l'ancien site minier de Rophin (Tableau 17), 8 souches bactériennes (O19 M1 -1 1 10 (*Shewanella putrefaciens* strain FDAARGOS_681), O19 M1 -1 2 11 (*Microbacterium natoriense* strain MLS-3-2), S20 SAB -3 1 11 (*Acidovorax facilis* strain CTM252), S20 SAO ND2 3 (*Acinetobacter lwoffii* strain k9), O19 MA ND1 11 (*Uncultured bacterium clone 26B1-F12*), O19 MA ND3 9 (*Acidovorax sp. 1608163*), O19 B2 ND2 6 (*Shewanella sp. Iso-W8*) et A17 N5 -1 2 5 (*Arthrobacter sp. NW-2013-Rh11*)) ont montré une croissance lente en présence d'uranium et/ou une faible élimination de l'uranium dans le milieu de culture. La faible croissance bactérienne observée pour ces souches peut être induite par la toxicité de l'uranium, dont plusieurs effets sur les cellules bactériennes sont avérés tels que l'inhibition de l'activité microbienne, la perte de viabilité cellulaire, l'inhibition transcriptionnelle et translationnelle, l'arrêt de la croissance, la suspension de la réplication de l'ADN et des dommages oxydatifs (Kolhe et al., 2018 ; Shuryak et al., 2019). La faible croissance observée pour ces souches concorde généralement avec une faible élimination de l'uranium signifiant que ces souches n'interagissent pas ou peu avec l'uranium et ne permettent pas une immobilisation et une diminution de la biodisponibilité de celui-ci dans le milieu. Il est également important de considérer qu'une faible quantité de nutriments dans le milieu peut entraîner une faible croissance bactérienne. Par conséquent, ces souches bactériennes ne seront pas étudiées par la suite pour explorer les mécanismes mis en place par les bactéries pour interagir avec l'uranium.

D'autre part, 9 souches bactériennes, dont 5 souches isolées à partir d'échantillons des sources minérales (Tableau 18) et 4 souches isolées à partir d'échantillons du site de Rophin (Tableau 17), ont montré un fort potentiel pour croître en présence d'uranium et/ou interagir avec celui-ci, permettant son élimination dans le milieu de culture. En particulier, les souches O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*), S20 SAB -1 1 3 (*Aeromonas salmonicida* strain A1), A17 12 -22 (*Serratia fonticola* strain N36-2-3-2) et A17 51 -24 (*Pseudomonas sp. F17*) ont montré une croissance rapide dans les deux milieux de culture en présence d'uranium. De plus, les souches O19 DO -1 2 16 (*Pseudomonas sp ADAK22*) et A17 N3 ND1 16 (*Pseudomonas jessenii* strain AP3_16) ont une croissance plus rapide dans le milieu FMM 2 que FMM 1 en présence d'uranium. D'autre part, ces 6 souches ont montré une très forte élimination de l'uranium comparées aux autres souches. En s'appuyant sur ces résultats, ces 6 souches bactériennes ont été sélectionnées pour étudier leur capacité à interagir et éliminer l'uranium du milieu de culture. Parmi ces 6 souches, 3 souches bactériennes proviennent des

sources minérales naturellement radioactives que sont O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*), O19 DO -1 2 16 (*Pseudomonas sp ADAK22*) et S20 SAB -1 1 3 (*Aeromonas salmonicida strain A1*). Les trois autres souches, provenant du ruisseau situé à l'aval de l'ancien site minier de Rophin, sont A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*), A17 51 -24 (*Pseudomonas sp. F17*) et A17 N3 ND1 16 (*Pseudomonas jessenii strain AP3_16*).

V- Caractérisation des mécanismes d'interaction entre les bactéries et l'uranium

Le deuxième objectif de cette étude est de comprendre quels mécanismes d'interaction mettent en place les bactéries avec l'uranium, leur permettant de se développer en présence de ce radioélément toxique (Simonoff et al., 2007 ; Merroun and Selenska-Pobell, 2008 ; Acharya, 2015 ; Kolhe et al., 2018). Comme décrit dans le chapitre 1, quatre mécanismes d'interaction sont connus entre les bactéries et l'uranium : la biosorption, la bioaccumulation, la biominéralisation et la bioréduction. L'objectif des expériences décrites dans cette partie est de discriminer parmi ces différents mécanismes, quels sont ceux mis en place par ces 6 souches bactériennes leur permettant d'éliminer l'uranium du milieu de culture. Le mécanisme de bioréduction a pu être éliminé car il est principalement observé chez les bactéries anaérobies qui se développent en utilisant l'uranium comme accepteur d'électrons (Kolhe et al., 2018 ; Lopez-Fernandez et al., 2021 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008 ; Shukla et al., 2017).

1) Exposition des bactéries à l'uranium dans une solution NaCl

La seconde expérience réalisée consistait à mettre en contact les 6 souches étudiées avec 100µM de nitrate d'uranyle dans une solution sans nutriment afin d'éviter toute interaction entre l'uranium et le milieu de culture. En effet, la présence de carbonate dans le milieu FMM pourrait entraîner la formation de complexes de carbonate d'uranyle qui pourrait modifier les interactions avec les bactéries. Par conséquent, le milieu FMM n'a pas été utilisé dans le cadre de ces expériences. L'objectif de cette expérience est d'exposer les bactéries à l'uranium sous sa forme la plus soluble et la plus mobile (UO_2^{2+}) (Markich, 2002). Pour cela, le pH du milieu de culture doit être judicieusement sélectionné afin que l'uranium soit sous forme U(VI) (UO_2^{2+}). La Figure 59 présente la spéciation théorique de l'uranium en fonction du pH dans la solution NaCl (0,9%) en présence d'une concentration de nitrate d'uranyle de 100µM (réalisée sur Visual MINTEQ 3.1).

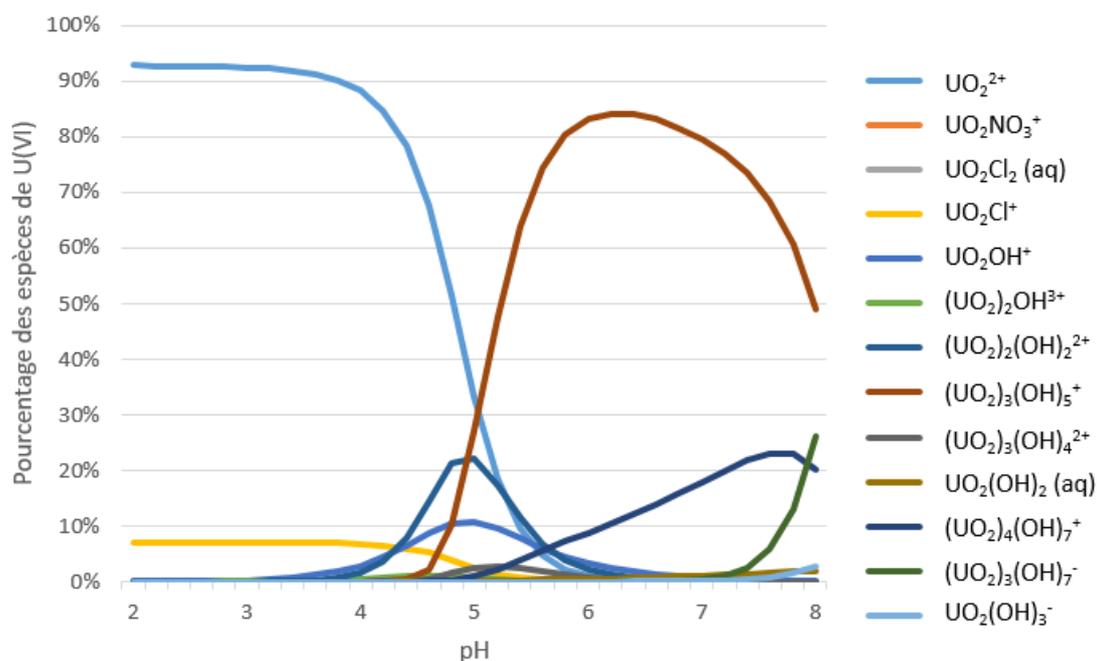


Figure 59: Spéciation théorique de l'uranium à 100µM dans une solution de NaCl (0,9%) en fonction du pH (Modélisation Visual MINTEQ 3.1)

D'après la modélisation Visual MINTEQ (3.1), dans cette solution de NaCl (0,9%) et à cette concentration d'uranium (100µM), l'uranium est principalement sous forme UO_2^{2+} pour un pH inférieur à 4,5. Au-dessus de pH 5, l'uranium est principalement sous forme hydroxylée, principalement sous forme $(UO_2)_3(OH)_5^+$. En effet, les formes hydroxylées sont les formes majoritaires entre pH 5 et 7 en absence de ligands comme les carbonates, sulfates et phosphates (Gadd et Fomina, 2011). Afin que les bactéries soient exposées à UO_2^{2+} , qui est la forme la plus soluble, mobile et donc toxique de l'uranium en solution (Husson et al., 2019 ; Kalin et al., 2005 ; Markich, 2002), le pH de la solution de NaCl (0,9%) a été fixé à 4 lors de cette expérience.

Ces résultats théoriques obtenus par Visual MINTEQ ont été confirmés par mesure de la concentration en uranium dans une solution de NaCl (0,9%) contenant 100µM de nitrate d'uranyle à pH 4 (à t1h et t24h). Avant chaque mesure, les solutions ont été centrifugées et la concentration en uranium a été mesurée dans le surnageant par spectrophotométrie. Les résultats sont donnés dans le Tableau 19 ci-dessous :

Tableau 19 : Mesure de la concentration en uranium (μM) par spectrophotométrie à t1h et t24h d'une solution de NaCl (0,9%) contenant 100 μM de nitrate d'uranyle à pH 4

Solution	Concentration uranium surnageant (μM) à t1h	Concentration uranium surnageant (μM) à t24h
Solution NaCl (0,9%) + 100μM U à pH 4	99,9 \pm 2,3	94,4 \pm 2,1
Solution NaCl (0,9%) à pH 4	0	0,1 \pm 0,1

Les concentrations en uranium mesurées à t1h et t24h sont très proches de la concentration théorique initialement introduite dans la solution de NaCl (0,9%). Ces résultats démontrent par conséquent que l'uranium reste soluble dans une solution de NaCl (0,9%) à pH 4 sur une durée de 24 heures.

Par la suite, les 6 souches bactériennes sélectionnées précédemment ont été exposées à une concentration de 100 μM de nitrate d'uranyle dans la solution de NaCl (0,9%) à pH 4 pendant 24 heures. Les cellules bactériennes ont été initialement inoculées pour une densité optique (DO) finale de 0,4 dans la solution. Des flacons avec des cellules bactériennes tuées par autoclavage (121°C pendant 20 minutes), et sans bactéries ont été testés comme témoins. Toutes les conditions ont été réalisées en triplicata. L'incubation des échantillons a été réalisée à 30°C pendant 24 heures. Les concentrations en uranium et en PO_4^{3-} ont été mesurées dans le surnageant (après centrifugation) à différents temps (t1h, t3h, t5h, t7h, t9h et t24h) par spectrophotométrie. Pour l'uranium, les résultats sont donnés en pourcentage d'élimination d'uranium par rapport au témoin sans bactéries (Figure 60).

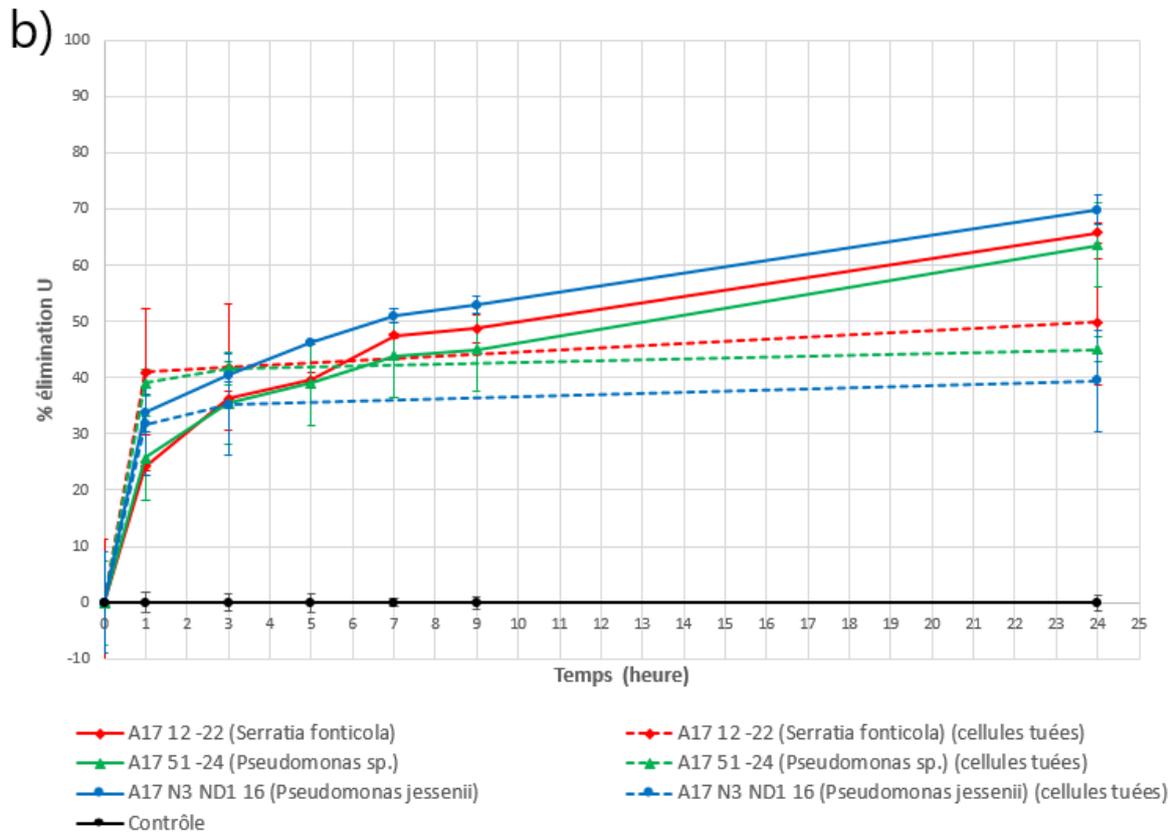
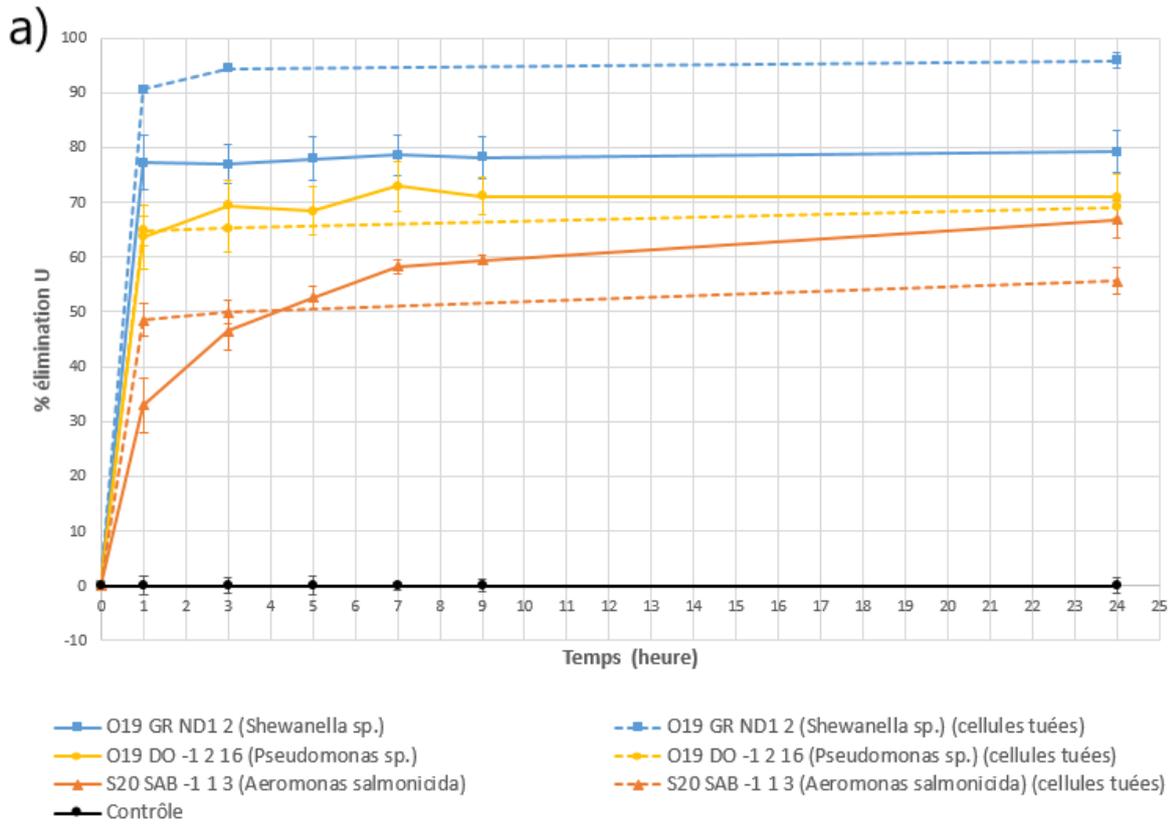


Figure 60 : Pourcentage d'élimination d'uranium (%) par rapport au contrôle : a) des 3 souches isolées des sources minérales (+ témoins cellules tuées); b) des 3 souches isolées du site de Rophin (+ témoins cellules tuées), dans une solution de NaCl (0,9%) avec 100 μ M de nitrate d'uranyle à pH 4 sur 24 heures

Sur cette Figure 60, les trois souches isolées des sources minérales naturellement radioactives (Figure 60.a), ainsi que les trois souches bactériennes isolées du site de Rophin (Figure 60.b) ont montré une forte élimination de l'uranium dans le milieu au bout de 24h. Une première hypothèse serait que cette élimination de l'uranium soit dû à une libération de phosphates par les souches bactériennes, qui par complexation avec l'uranium, permettrait sa précipitation dans le milieu de culture. En effet, bien qu'aucune source de phosphate extérieur n'ait été ajoutée à la solution, certaines bactéries ont déjà démontré la capacité de bioprécipiter l'uranium à pH 4,5 par l'intermédiaire de phosphatases acides en l'absence de substrats phosphatés organiques (Merroun et al., 2011 ; Panak et al., 2002 ; Reitz et al., 2014). Les auteurs avaient déterminé qu'en l'absence d'une source de phosphate organique, la seule origine possible de substrats organiques contenant des phosphates était les composés cellulaires, tels que les acides nucléiques, libérés par les cellules mortes et endommagées (Merroun et al., 2011 ; Reitz et al., 2014). Une autre étude avait également observé une précipitation de l'uranium due à une libération de phosphates dissous dans le milieu provenant de la lyse de cellules (composées de polymères et acides nucléiques riche en phosphate) induite par la chaleur pendant l'autoclavage (Sivaswamy et al., 2011). Cependant, pour l'expérience réalisée dans le cadre de cette thèse, les concentrations en phosphate mesurées au fil de temps pour chaque condition étaient inférieures aux limites de détection de la méthode spectrophotométrique utilisée ($<10\mu\text{M}$). Ces résultats signifient qu'aucune libération significative de phosphates n'a eu lieu au cours de ces expériences, que ce soit par les cellules vivantes ou par les cellules mortes. L'élimination de l'uranium observée pour chaque souche étudiée ne serait donc pas liée à une libération de phosphate dans le milieu par ces cellules bactériennes.

La souche O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) et la souche O19 DO -1 2 16 (*Pseudomonas sp ADAK22*) ont éliminé 79% et 71% d'uranium dans le milieu après 24 heures. Ces deux souches éliminent l'uranium très rapidement, atteignant l'élimination maximale d'uranium en quasiment 1 heure (77% et 63% d'élimination d'uranium à 1h respectivement). De plus, la biomasse morte de ces deux souches a également montré un fort pourcentage d'élimination. Pour la souche O19 DO -1 2 16, la biomasse morte a montré une élimination similaire à celui observé avec les cellules vivantes de cette souche, alors que la biomasse morte de O19 GR ND1 2 a montré une meilleure efficacité d'élimination que les cellules vivantes. Ceci indique que l'élimination de l'uranium par ces deux souches est indépendante du métabolisme de celles-ci. L'élimination de l'uranium observée dans le milieu pour ces deux

souches bactériennes est probablement due à un phénomène de biosorption de l'uranium à la surface des cellules bactériennes. En effet, la biosorption, définie comme la séquestration des ions métalliques chargés positivement par les membranes cellulaires chargées négativement et les polysaccharides sécrétés sur les surfaces extérieures des bactéries (Prakash et al., 2013), est un phénomène souvent rapide et indépendant des processus métaboliques des bactéries (Gadd, 2009 ; Kolhe et al., 2018 ; Lopez-Fernandez et al., 2021 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008 ; Shukla et al., 2017).

D'autre part, les souches S20 SAB -1 1 3 (*Aeromonas salmonicida* strain A1) (69%), A17 N3 ND1 16 (*Pseudomonas jessenii* strain AP3_16) (70%), A17 12 -22 (*Serratia fonticola* strain N36-2-3-2) (66%) et A17 51 -24 (*Pseudomonas* sp. F17) (64%) ont également montré une forte élimination de l'uranium dans le milieu après 24 heures. Une élimination rapide de l'uranium après 1 heure est également observée pour ces quatre souches. Cependant, contrairement à ce qui a été observé pour les souches O19 GR ND1 2 (*Shewanella* sp. strain A16OP11) et O19 DO -1 2 16 (*Pseudomonas* sp ADAK22), le pourcentage d'élimination augmente à chaque mesure, jusqu'à atteindre le maximum d'élimination au bout de 24 heures. En outre, pour les souches S20 SAB -1 1 3 (*Aeromonas salmonicida* strain A1), A17 N3 ND1 16 (*Pseudomonas jessenii* strain AP3_16), A17 12 -22 (*Serratia fonticola* strain N36-2-3-2) et A17 51 -24 (*Pseudomonas* sp. F17), la biomasse morte a montré une élimination plus faible de l'uranium que les cellules vivantes après 24 heures, avec respectivement 56%, 40%, 50%, et 45%. De plus, pour la biomasse morte, le maximum d'élimination est atteint en 1 heure d'exposition contrairement à ce qui a été observée pour les cellules vivantes. Ceci indique que pour ces quatre souches (S20 SAB -1 1 3, A17 N3 ND1 16, A17 12 -22 et A17 51 -24), un mécanisme actif des cellules serait responsable de l'augmentation de l'élimination de l'uranium dans le milieu. L'hypothèse émise pour ces souches serait que les cellules de ces souches interagissent avec l'uranium par des processus passifs et actifs. Tout d'abord, l'élimination rapide de l'uranium observée dans le milieu serait dû à des phénomènes de biosorption de l'uranium à la surface des cellules. Par la suite, ces souches mettraient en œuvre des mécanismes actifs tels que la bioaccumulation qui permettent à l'uranium de pénétrer à l'intérieur des cellules par voie active et entraînent également son élimination de la solution de NaCl (0,9%). Bien que la combinaison de différents mécanismes d'interaction avec l'uranium semble raisonnable dans un consortium bactérien, des études ont également démontré cette capacité pour des souches microbiennes individuelles (Sánchez-Castro et al., 2020 ; Song et al., 2019).

Afin de vérifier ces hypothèses, les souches O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) et A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) ont été observées par microscopie électronique à transmission (TEM) dans des conditions identiques pour déterminer si l'uranium est situé à la surface et/ou à l'intérieur des cellules. L'apparence des cellules bactériennes non exposées et exposées à 100 μ M de nitrate d'uranyle dans la solution de NaCl (0,9%) est présentée sur la Figure 61 (O19 GR ND1 2 - *Shewanella sp. strain A16OP11*) et la Figure 62 (A17 12 -22 - *Serratia fonticola strain N36-2-3-2*).

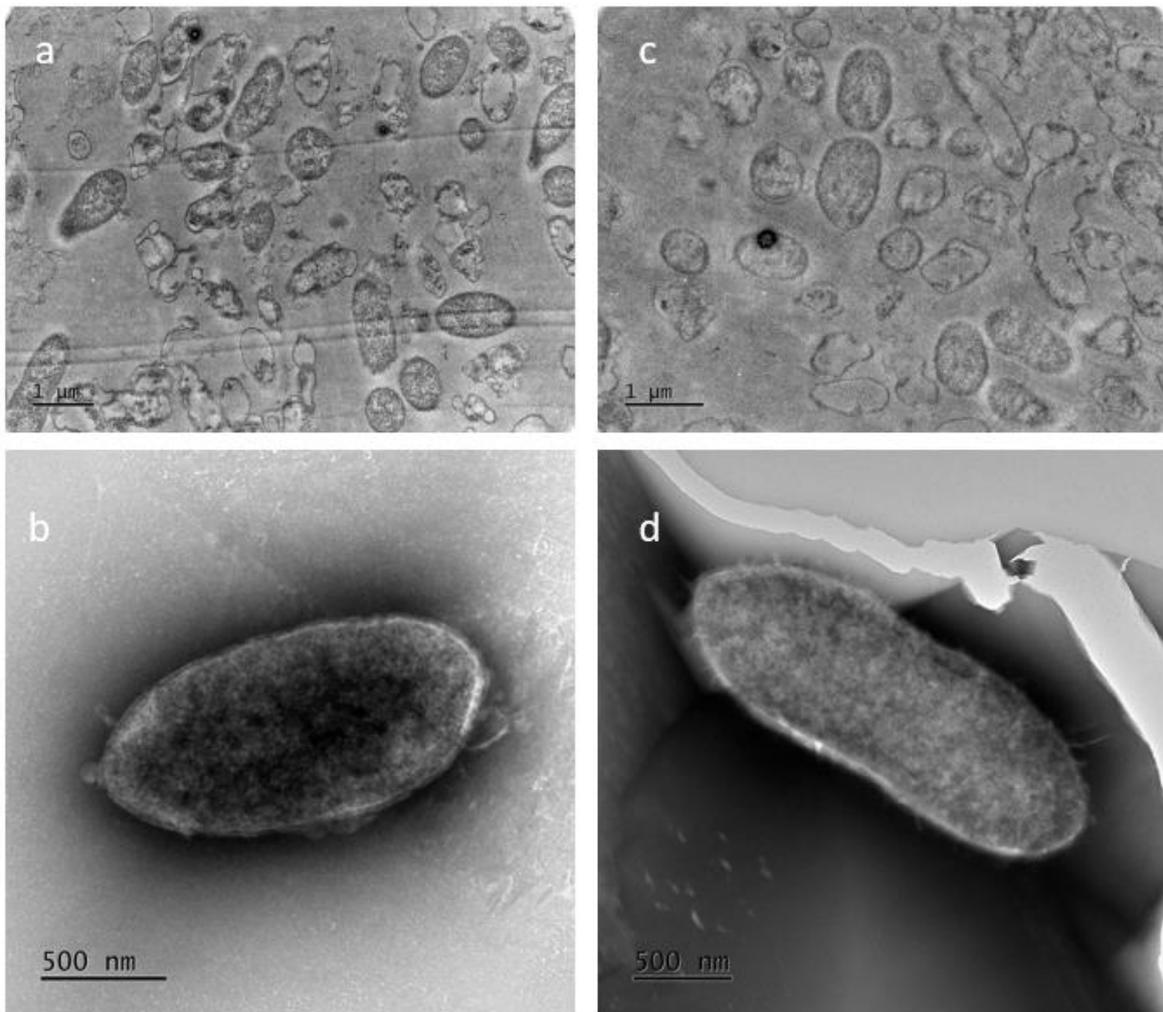


Figure 61: Analyse par microscopie à transmission des cellules de O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) en présence de 100 μ M de nitrate d'uranyle dans une solution de NaCl (0,9%) à pH 4. Images de (A) Cellules témoin non exposées à l'uranium observées par traitement conventionnel ; (B) Cellules témoin non exposées à l'uranium observées par coloration négative ; (C) Cellules exposées à l'uranium observées par traitement conventionnel ; (D) Cellules exposées à l'uranium observées par coloration négative

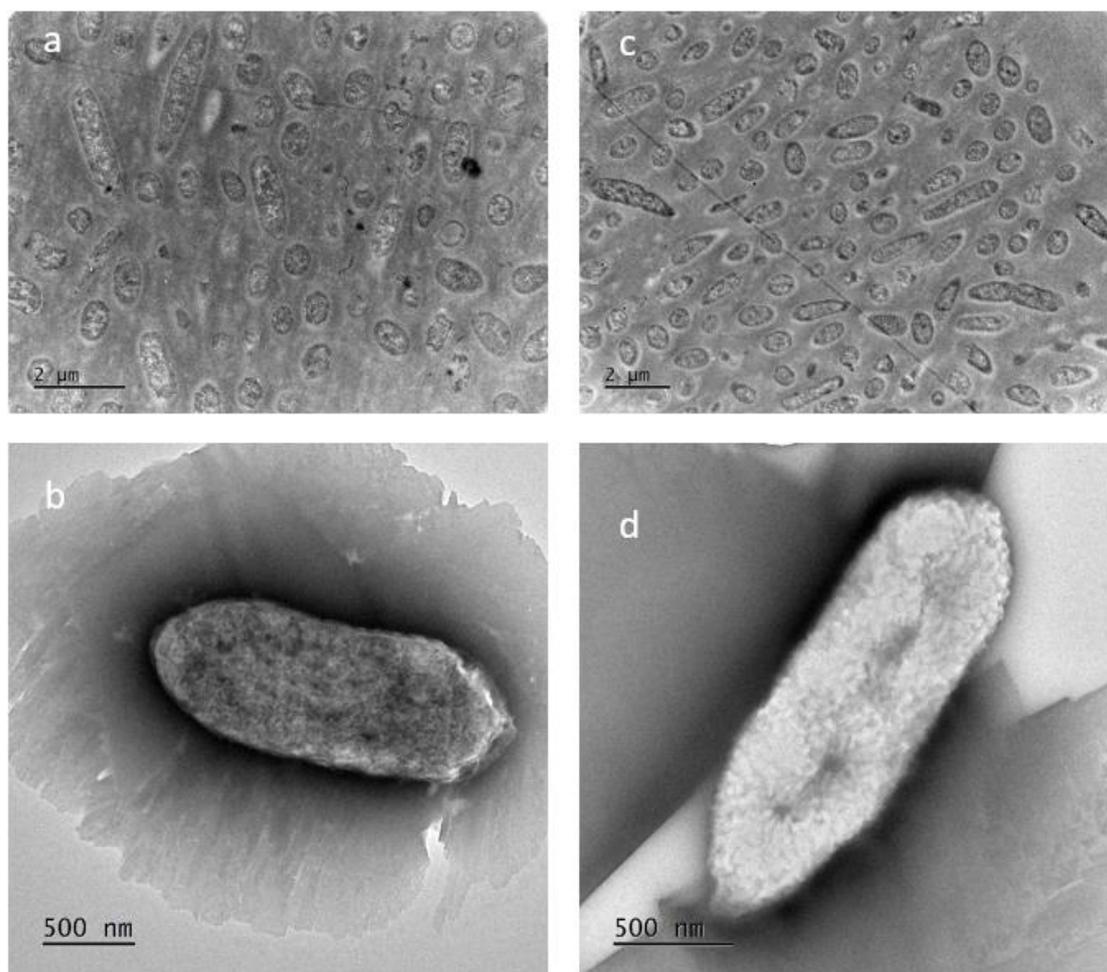


Figure 62 : Analyse par microscopie à transmission des cellules de A17 12 -22 (*Serratia fonticola* strain N36-2-3-2) en présence de $100\mu\text{M}$ de nitrate d'uranyle dans une solution de NaCl (0,9%) à pH 4. Images de (A) Cellules témoin non exposées à l'uranium observées par traitement conventionnel ; (B) Cellules témoin non exposées à l'uranium observées par coloration négative ; (C) Cellules exposées à l'uranium observées par traitement conventionnel ; (D) Cellules exposées à l'uranium observées par coloration négative

Sur ces images, l'état des bactéries est identique en présence ou en absence d'uranium pour les deux souches observées. Ceci indique que les structures cellulaires ont été bien conservées lors de l'exposition à l'uranium. Cependant, bien que ces cellules aient entraîné une élimination de l'uranium dans la solution de NaCl (0,9%) aucun précipité d'uranium n'a été observé à la surface ou à l'intérieur des cellules. L'absence d'uranium a été confirmée par une observation en STEM/X-EDS des cellules bactériennes des deux souches étudiées. Une hypothèse serait que lors des différentes étapes de lavage réalisées au préalable des observations microscopiques, l'uranium aurait été éliminé. Une autre étude, ayant observé une adsorption de l'uranium à la surface des cellules de *Paenibacillus sp. JG-TB8*, n'a également pas pu détecter l'uranium par TEM-EDX (Reitz et al., 2014) supposant que la limite de détection de l'EDX ne permettait pas d'observer des petits précipités ou des complexes d'uranium formés au niveau

des groupes fonctionnels chargés négativement à la surface des cellules. Cette hypothèse pourrait être également avancée dans le cadre de notre expérience.

Comme décrit ci-dessus, ces résultats démontrent que des mécanismes indépendants du métabolisme de ces souches, probablement basés sur la sorption de l'uranium à la surface des cellules bactériennes, sont très rapidement mis en place par celles-ci dans le cadre de cette expérience. D'autres études ont également décrit une immobilisation de l'uranium par adsorption rapide de celui-ci à la surface des cellules dus à des mécanismes passifs (Nakajima et Tsuruta., 2004 ; Pan et al., 2015 ; Panak et al., 2002 ; Xie et al., 2008 ; Zhang et al., 2018). Ces six souches étudiées sont toutes des bactéries Gram négatives, dont les lipopolysaccharides (LPS) et les composants de la paroi cellulaire jouent un rôle important dans la fixation de l'uranium sur la surface cellulaire (Kolhe et al., 2018 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008). Plus particulièrement, les phospholipides et les groupes phosphates des LPS sont fortement impliqués dans la fixation des ions métalliques chez les bactéries Gram négatives (Gadd, 2009 ; Kolhe et al., 2018 ; Panak et al., 2002). D'autres groupes fonctionnels bactériens situés à la surface des cellules bactérienne (par exemple carboxyle, hydroxyle, amino et phosphoryle) sont connus pour fournir des sites de liaison efficaces pour l'uranium (Francis et al., 2004 ; Haas et al., 2001 ; Lopez-Fernandez et al., 2021 ; Sánchez-Castro et al., 2020 ; Shukla et al., 2017 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008 ; Xie et al., 2008 ; Zhang et al., 2018). Néanmoins, dans le cadre de notre expérience, les analyses réalisées n'ont pas permis de déterminer les groupes fonctionnels impliqués dans l'adsorption de l'uranium. Afin de déterminer ces groupes fonctionnels liant l'uranium à la surface de ces 6 souches étudiées, une analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) aurait pu être mis en place comme réalisée dans d'autres études (Choudhary et Sar, 2011 ; Goswami et al., 2017 ; Liu et al., 2019 ; Zhang et al., 2018).

Ces résultats sont observés dans des conditions expérimentales précises et favorable à la biosorption de l'uranium, c'est-à-dire à pH acide (4), dans une solution simple de NaCl (0,9%) permettant de limiter les interactions avec l'uranium, et à une concentration initiale de cellules bactériennes données (DO environ 0,4). En effet, l'adsorption de l'uranium sur la surface des cellules dépend de plusieurs paramètres, dont principalement le pH, l'état physiologique des cellules, et la présence d'éléments organiques ou inorganiques (Kolhe et al., 2018 ; Shukla et al., 2017 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008). Des modifications du pH de la solution peuvent influencer de manière significative la spéciation de l'uranium (Figure 59), mais également les propriétés électroniques de la surface cellulaire, affectant les liaisons entre l'uranium et la

surface cellulaire des bactéries (Kolhe et al., 2018 ; Zhang et al., 2018). Par exemple, Kelly et al., (2002) ont montré qu'à un pH très faible (1,67), UO_2^{2+} se lie uniquement aux groupes fonctionnels phosphoryles sur la paroi cellulaire de *Bacillus subtilis*, alors qu'à un pH plus élevé (3,22 et 4,8), UO_2^{2+} se lie préférentiellement aux groupes fonctionnels carboxyles. D'autre part, Sheng et Fein, (2013) ont également démontré que la teneur en U(VI) adsorbée par *Shewanella oneidensis MR-1* était indépendante de la concentration en carbone inorganique dissous en dessous de pH 5 en raison de l'absence de complexes de carbonate d'uranyle. Au contraire, au-dessus de pH 5, la teneur en U(VI) adsorbée diminuait avec l'augmentation des concentrations de carbone inorganique dissous due à la formation de carbonates d'uranyle-hydroxyde anioniques sur les surfaces bactériennes. Dans le cadre de notre expérience, les résultats d'élimination d'uranium observés pour les 6 souches étudiées ont été obtenus dans des conditions expérimentales précises et favorable à la biosorption de l'uranium. En effet, le choix d'un pH initial à 4 favorise l'adsorption de l'uranium à la surface des bactéries due à la présence majoritaire du cation uranyle (UO_2^{2+}) (Sheng et Fein, 2013). De plus, les bactéries sont mises en contact avec l'uranium dans une solution de NaCl (0,9%) permettant de limiter les interactions entre des éléments du milieu avec l'uranium. Cependant, ces conditions expérimentales sont très différentes des conditions environnementales d'où ces souches ont été isolées, avec des valeurs de pH variant de 6 à 7. De ce fait, il serait intéressant d'étudier la capacité d'adsorption (isotherme d'adsorption) de l'uranium par ces souches sur une gamme de pH (par exemple de 3 à 9).

De plus, un des principaux inconvénients de la biosorption est la saturation rapide des groupes fonctionnels anioniques de la paroi cellulaire par les cations métalliques, ainsi que la désorption compétitive due à la présence de cations autres que le cation souhaité, pour le site de fixation de la cellule (Jabbar et Wallner, 2015 ; Shukla et al., 2017). Par conséquent, malgré le potentiel de biosorption de l'uranium par les bactéries, cette méthode est peu utilisée dans un contexte de bioremédiation, particulièrement *in situ*, bien qu'elle puisse éventuellement être utilisée pour traiter de faibles concentrations d'uranium d'effluents contaminés dans le cadre d'un scénario de « pompage et traitement » (Newsome et al., 2014). Il paraît donc intéressant d'étudier si ces souches bactériennes peuvent immobiliser l'uranium par d'autres mécanismes, dont la biominéralisation, technique qui a déjà démontré un fort potentiel pour la bioremédiation de l'uranium (Newsome et al., 2014 ; Song et Fein., 2014).

2) Exploration du potentiel de biominéralisation de l'uranium des souches O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp.*) et A17 12 -22 (*Serratia fonticola*)

Il s'agit désormais d'observer si les souches *Shewanella sp. strain A16OP11* et *Serratia fonticola strain N36-2-3-2* sont capables d'immobiliser une plus forte concentration d'uranium par un mécanisme de biominéralisation de l'uranium à un pH proche des conditions environnementales. Comme décrit dans le chapitre 1, la biominéralisation désigne le processus enzymatique par lequel les bactéries vont libérer des ligands organiques, interagissant avec les ions uranyle en solution qui vont précipiter sous formes de minéraux insolubles (Kolhe et al., 2018). Un mécanisme bien étudié de biominéralisation de l'uranium par des bactéries est basé sur l'activité enzymatique des phosphatases (Sánchez-Castro et al., 2020 ; Reitz et al., 2014). Ces enzymes, exprimées par de nombreuses bactéries, permettent la libération d'orthophosphates inorganiques à partir de composés phosphatés organiques (Newsome et al., 2014 ; Reitz et al., 2014). L'orthophosphate libéré interagit avec l'uranium entraînant la précipitation de ce dernier sous forme de minéraux de phosphate d'uranyle (Kolhe et al., 2018 ; Reitz et al., 2014 ; Rogiers et al., 2022). L'objectif de cette expérience est d'explorer si les souches bactériennes O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) et A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) sont capables de libérer des orthophosphates dans le milieu en présence d'une source de phosphate organique, et si ces orthophosphates se complexent avec l'uranium permettant sa précipitation dans le milieu.

a) Conditions expérimentales

Plusieurs sources de phosphates ont été utilisées pour étudier la biominéralisation de l'uranium par les phosphatases, telles que le β -glycérophosphate (appelé également glycérol-2-phosphate) (Chandwadkar et al., 2018), le glycérol-3-phosphate (Powers et al., 2002), le phytate (Li et al., 2019) et le polyphosphate (Renninger et al., 2004). Cependant, l'uranium, qui se complexe facilement avec le phosphate (Gadd et Fomina, 2011), peut précipiter en raison de la libération abiotique d'orthophosphate dans le milieu (Newsome et al., 2015). Il est donc judicieux de choisir une source de phosphate limitant cette précipitation abiotique de l'uranium, afin d'observer l'effet des bactéries sur l'élimination de l'uranium dans le milieu. Une synthèse bibliographique a été conduite afin de sélectionner les conditions optimales pour observer une précipitation de l'uranium due à l'activité phosphatase des deux souches bactériennes étudiées. Les résultats de cette analyse sont résumés dans le Tableau 20 ci-dessous.

Tableau 20 : Synthèse bibliographique des conditions expérimentales d'études traitant de la biominéralisation de l'uranium par différentes souches bactériennes

Publications	DO initiale	Milieu (tampon)	Source de phosphate	pH	Uranium	Conditions expérimentales	Contrôle
Khare et al., 2020	2	Acetate 100mM	β -glycerophosphate 5mM	5	Nitrate uranyle 1mM	30°C, condition statique : prélèvement aliquotes -> centrifugation 7800g pendant 3 min et mesure U dans le surnageant par méthode Arsenazo III	Biotique (cellules tuées par la chaleur) et abiotique (sans cellules)
	2	MOPS 20mM	β -glycerophosphate 5mM	7	Carbonate uranyle 1mM		
	2	MOPS 20mM	β -glycerophosphate 5mM	9	Carbonate uranyle 1mM		
Chandwadkar et al., 2018	2	Acetate 100mM	β -glycerophosphate 5mM	5	nitrate uranyle 1mM	30°C, condition statique 120h : prélèvement aliquotes -> centrifugation 7800g pendant 3 min et mesure U dans le surnageant par méthode Arsenazo III	Biotique (cellules tuées par la chaleur) et abiotique (sans cellules) + addition d'inhibiteurs de phosphatases
	2	MOPS 20mM	β -glycerophosphate 5mM	7	Carbonate uranyle 1mM		
	2	MOPS 20mM	β -glycerophosphate 5mM	9	Carbonate uranyle 1mM		
Sanchez et al., 2020	phase de croissance exponentielle (~ 0,5 DO)	MOPS 20mM	glycerol-2-phosphate 5mM	5 / 6,3 / 8	Nitrate uranyle (0,01; 0,1; 0,5; 1 mM)	28°C pour 48h sous agitation : prélèvement aliquotes -> centrifugation 10000g pendant 10 min : mesure U surnageant par ICP-MS	Sans uranium / Cellules tuées / sans bactérie
Macaskie et al., 2000	phase de croissance exponentielle (~ 0.4 DO)	Trisodium citrate/tampon acide citrique	glycerol-2-phosphate 5mM	6,9	Nitrate uranyle 1mM	Aliquotes (1,25ml) centrifugé (13700g, 5min 22°C) et mesure U surnageant par Arsenazo III	-
Newsome et al., 2015	cellules en phase stationnaire	bicarbonate	glycerol-2-phosphate 10mM	-	U(VI) 1mM	Mesure U surnageant par méthode Bromo-Padap	-
Nilgiriwala et al., 2008	1	carbonate-bicarbonate buffer 2mM	β -glycerophosphate 5mM	9,2	Carbonate uranyle (0,5 à 5mM)	30°C, condition statique, 5ml : Aliquotes à différents intervalles de temps: centrifugé 10000g-10min et mesure U surnageant par Arsenazo III	Biotique (cellules tuées par la chaleur) et abiotique (sans cellules)
Kulkarni et al., 2016	1	MOPS 10mM	β -glycerophosphate 5mM	7	Nitrate uranyle 1mM	30°C, condition statique, aliquotes : centrifugés 12000g-10min et mesure U surnageant par Arsenazo III	Utilisation cellules sans vecteur phosphatase

Cette analyse bibliographique a montré que de nombreuses études sur la biominéralisation de l'uranium par des bactéries, ont utilisé le β -glycérophosphate (glycérol-2-phosphate) à une concentration de 5mM comme source de phosphate. De plus, le tampon MOPS (20mM) est également souvent utilisé et semble peu interagir avec l'uranium. Pour vérifier la solubilité de l'uranium dans une solution de MOPS (20mM) et le β -glycérophosphate (5mM), la spéciation théorique de l'uranium a été modélisée pour une concentration initiale de nitrate d'uranyle de 1mM entre pH 4 et 9 (Figure 63).

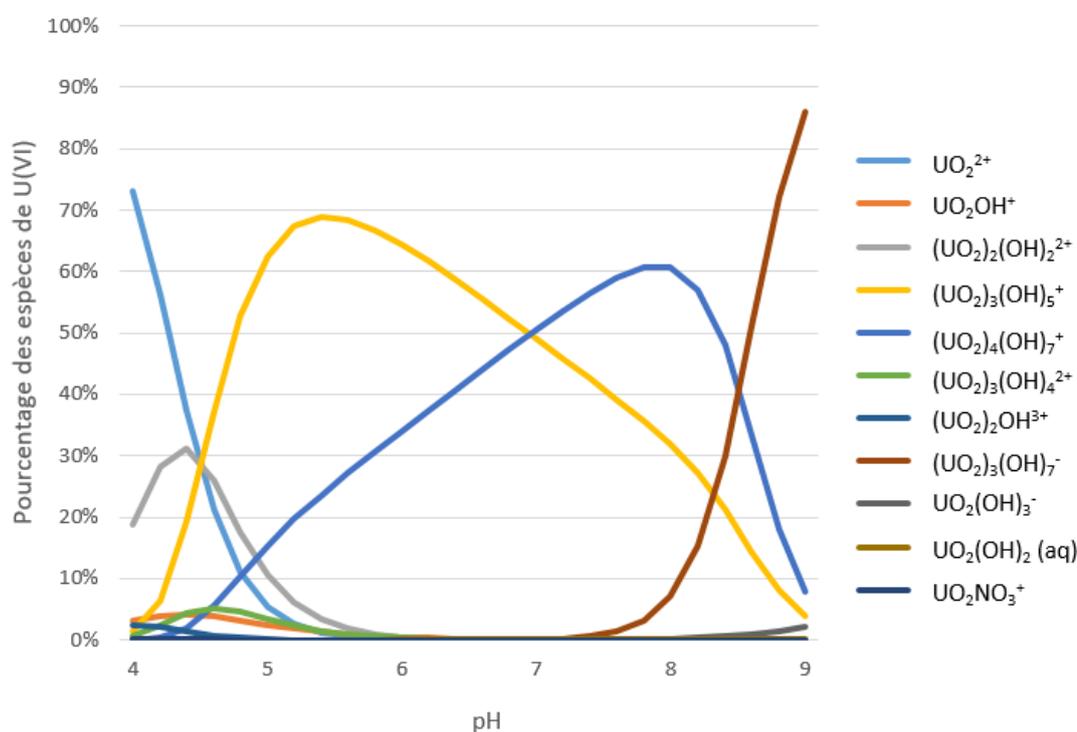


Figure 63 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM dans une solution de MOPS (20mM) + β -glycérophosphate (5mM) en fonction du pH (Modélisation Visual MINTEQ 3.1)

D'après la modélisation Visual MINTEQ (3.1), pour un pH inférieur à 4,5, la forme majoritaire de l'uranium est l'ion UO_2^{2+} . Entre pH 5 et 9, l'uranium est principalement sous forme hydroxylée, avec la forme $(UO_2)_3(OH)_5^+$ majoritaire entre pH 5 et 7, la forme $(UO_2)_4(OH)_7^+$ majoritaire entre pH 7 et 8, et la forme $(UO_2)_3(OH)_7^-$ majoritaire à partir d'un pH de 8.5. Pour notre expérience, le pH de la solution de MOPS (20mM) + β -glycérophosphate (5mM) + nitrate d'uranyle (1mM) a été fixé à 7 afin d'explorer la capacité de ces souches bactériennes à immobiliser l'uranium à un pH proche des conditions environnementales d'où elles proviennent. A pH 7, d'après cette modélisation, les formes majoritaires sont les formes

cationiques hydroxylées $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ et $(\text{UO}_2)_4(\text{OH})_7^+$ qui sont des formes solubles en solution (Markich, 2002).

Ces résultats théoriques obtenus par modélisation sur Visual MINTEQ ont été confirmés en vérifiant la solubilité de l'uranium dans une solution de MOPS (20mM) et β -glycérophosphate (5mM) contenant 1mM de nitrate d'uranyle à pH 7. Pour cela, la concentration en uranium a été suivie sur 3 jours par spectrophotométrie (méthode Bromo Padap). Les résultats sont donnés dans le Tableau 21 ci-dessous.

Tableau 21 : Mesure de la concentration en uranium (μM) par spectrophotométrie à t_1j , t_2j et t_3j d'une solution de MOPS (20mM) + β -glycérophosphate (5mM) contenant 1mM de nitrate d'uranyle à pH 7

Jour	Concentration uranium mesurée (μM)
1	899 \pm 46
2	887 \pm 59
3	923 \pm 23

Les concentrations mesurées en uranium sur 3 jours sont légèrement inférieures à la concentration théorique initialement introduite dans la solution de MOPS (20mM) + β -glycérophosphate (5mM). Cette légère diminution peut être due soit à une légère précipitation abiotique de l'uranium dans le milieu ou à la présence de formes chimiques de l'uranium n'interagissant pas avec le réactif Bromo Padap telles que $\text{UO}_2(\text{OH})_2$, en raison de sa nature inerte, ou des formes anioniques, telles que $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_7^-$, en raison des interactions répulsives entre le Bromo Padap et cette forme chimique chargée négativement (Rawat et al., 2006). Cependant, ces résultats ont démontré que l'uranium, à une concentration de 1mM, restait en majorité soluble dans une solution de MOPS (20mM) + β -glycérophosphate (5mM) pendant 3 jours à pH 7.

Par conséquent, dans le cadre de notre expérience, les cellules bactériennes des souches O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) et A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) ont été exposées à 1mM de nitrate d'uranyle dans une solution de MOPS (20mM) fixée

à pH 7, avec comme seule source de phosphate du β -glycérophosphate (5mM). Les cellules bactériennes ont été initialement inoculées pour une densité optique (DO) finale de 0,4 dans la solution. Des flacons avec des cellules bactériennes tuées par autoclavage (121°C pendant 20 minutes) en présence d'uranium, sans bactéries en présence d'uranium, et avec des bactéries sans uranium ont été testés comme témoin. Toutes les conditions ont été réalisées en triplicata. L'incubation des échantillons a été réalisée à 30°C pendant 3 jours. Les concentrations en uranium et en PO_4^{3-} ont été mesurées dans le surnageant (après centrifugation) à différents temps (t0, t1j, t2j et t3j) par spectrophotométrie. La capacité des cellules des souches O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) et A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) à éliminer l'uranium a été étudiée en calculant le pourcentage d'U(VI) dissous éliminé dans la solution par rapport au témoin sans bactéries. Les Figure 64 et Figure 65 ci-dessous présentent les résultats obtenus pour chacune des souches étudiées.

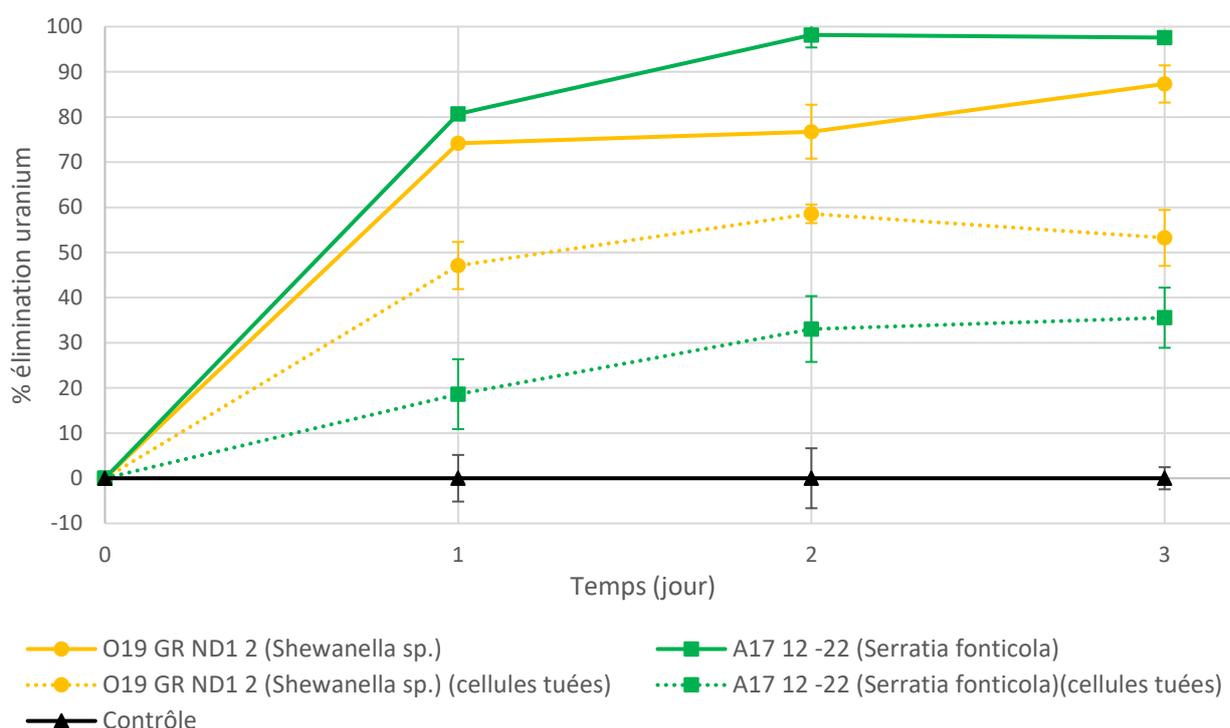


Figure 64 : Pourcentage d'élimination d'uranium par rapport au contrôle des souches O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) et A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) (+ témoins cellules tuées) dans une solution de MOPS (20mM) + β -glycérophosphate (5mM) avec 1mM de nitrate d'uranyle à pH 7 sur 3 jours

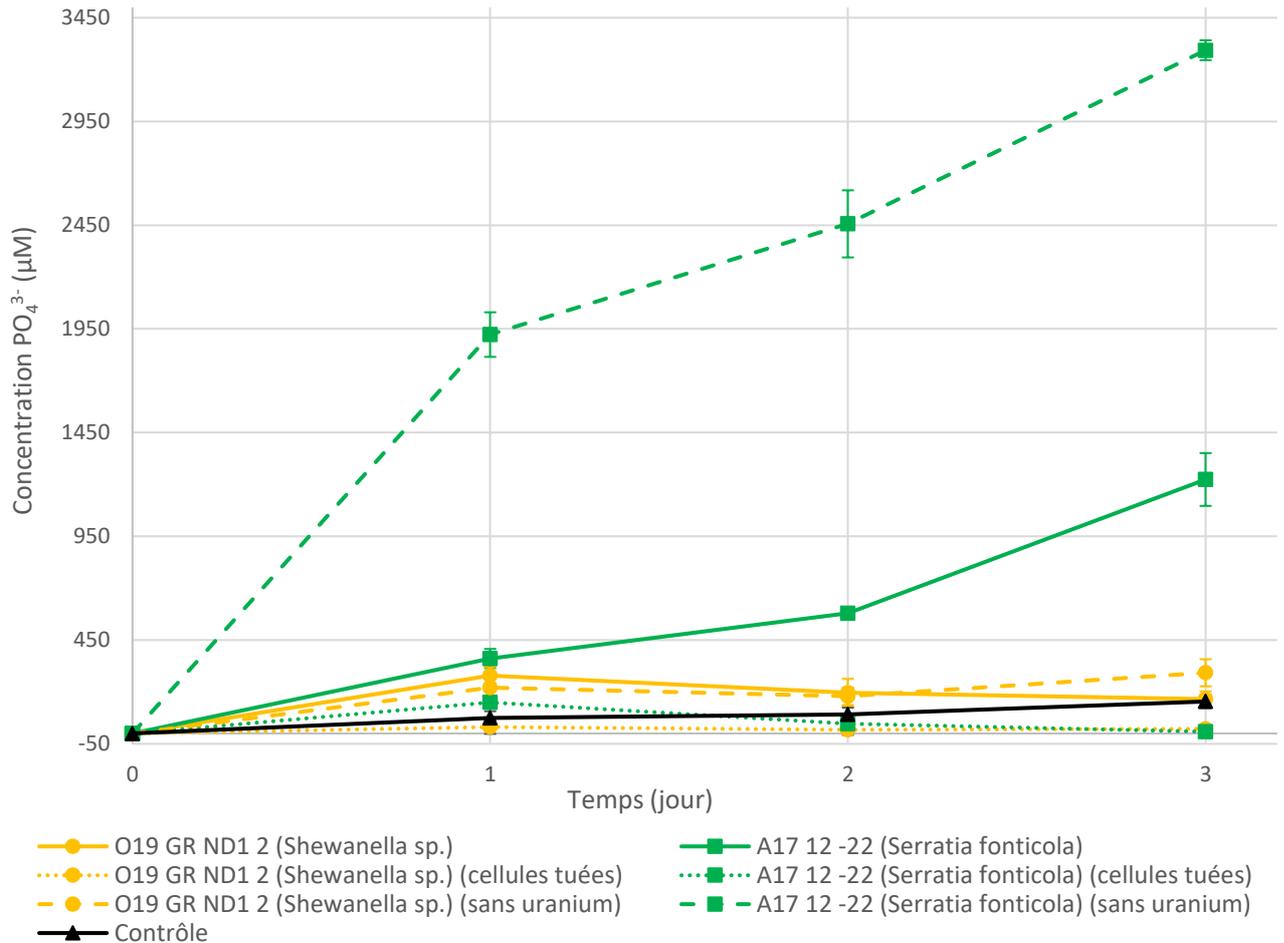


Figure 65 : Concentration en orthophosphate (PO_4^{3-}) pour les souches O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) et A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) (+ témoins cellules tuées et témoin sans uranium) dans une solution de MOPS (20mM) + β -glycérophosphate (5mM) avec 1mM de nitrate d'uranyle à pH 7 sur 3 jours

b) Élimination de l'uranium par la souche O19 GR ND1 2

Après 1 jour d'incubation, les cellules de O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp.*) ont permis l'élimination de 75% de l'uranium dans la solution, augmentant jusqu'à 87% après 3 jours d'incubation. Les cellules tuées par autoclavage ont montré une élimination de 53% après 3 jours d'incubation, ce qui indique que l'élimination de l'uranium par cette souche bactérienne est due à l'implication de processus passifs et actifs. Comme décrit dans l'expérience précédente, des mécanismes indépendants du métabolisme, probablement basés sur la biosorption de l'uranium à la surface des cellules, permettent d'expliquer en partie l'élimination de l'uranium par cette souche. Cependant, des mécanismes actifs semblent également mis en place par cette souche, permettant l'immobilisation de l'uranium. La concentration en orthophosphate mesurée en présence ou absence d'uranium était faible pour cette souche, bien

que légèrement supérieure au témoin abiotique et aux cellules tuées. Ceci suggère que l'élimination active de l'uranium par cette souche n'est probablement pas liée à la biominéralisation de l'uranium due à une libération d'orthophosphate à partir du β -glycérophosphate par cette souche. Afin de caractériser le mécanisme actif mis en place par cette souche, la localisation cellulaire de l'uranium a été déterminée par observations des cellules en STEM/X-EDS. Les cellules ont été déposées directement sur la grille de carbone et observées au microscope électronique à transmission afin de limiter les pertes d'uranium lors des étapes de fixation des cellules. Les images STEM obtenues sont présentées sur la Figure 66.

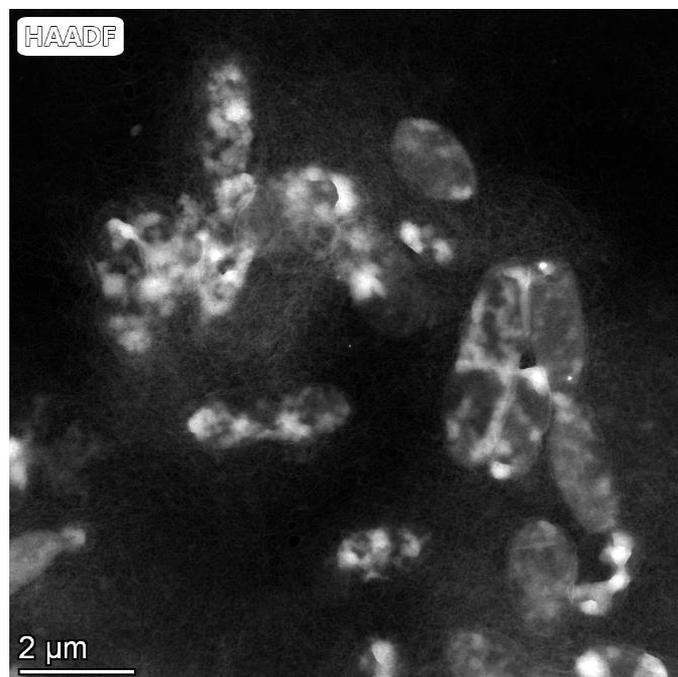


Figure 66 : Observation par microscopie électronique à transmission (en STEM-HAADF) de cellules d'O19 GR ND1 2 déposées directement sur la grille de carbone après 3 jours en présence de 1mM de nitrate d'uranyle

Tout d'abord, une observation globale des cellules, mises en contact avec l'uranium, a permis d'observer qu'il n'y avait pas de cristaux d'uranium au niveau extracellulaire. Par conséquent, ces observations confirment que l'uranium n'est pas précipité dû à la libération d'orthophosphate dans le milieu par la souche O19 GR ND1 2 (Figure 66). Les images STEM et cartes élémentaires par X-EDS obtenues sur une cellule d'O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp.*) sont illustrées sur la Figure 67 ci-dessous.

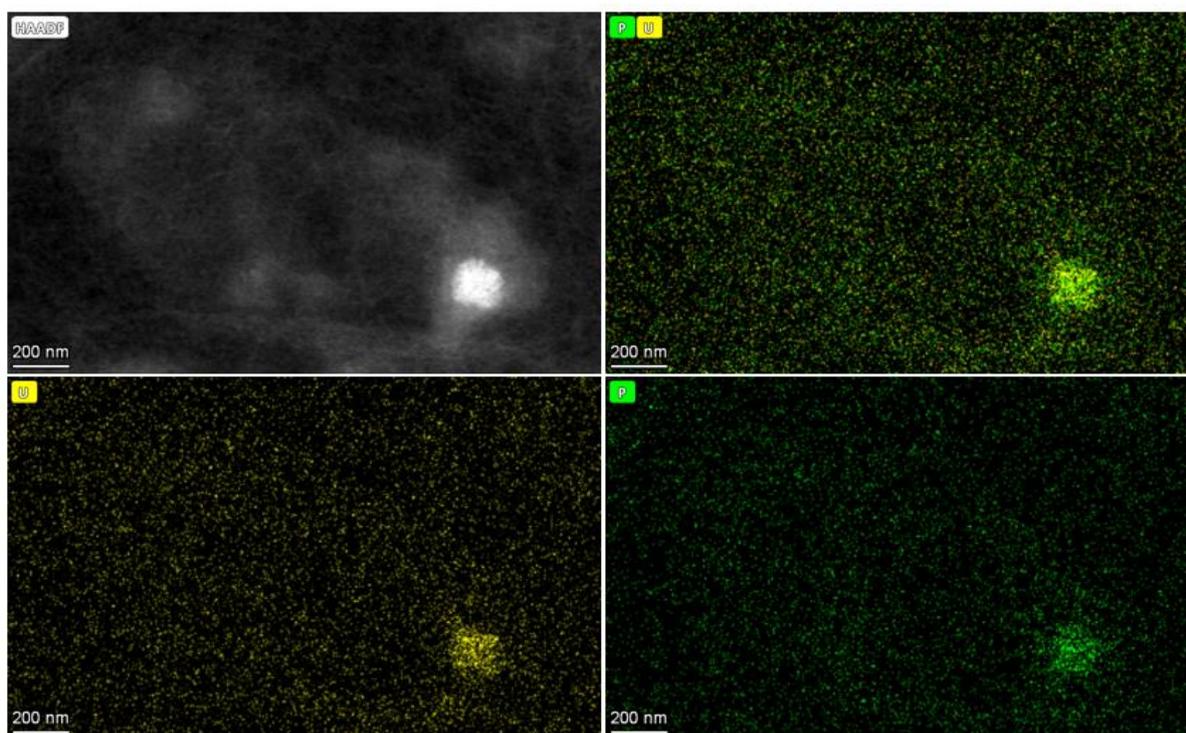


Figure 67 : Observation par microscopie électronique à transmission (en STEM-HAADF) a) d'une cellule zoomée d'O19 GR ND1 2 déposés directement sur la grille de carbone après 3 jours en présence de 1mM de nitrate d'uranyle. Cartes de distribution par X-EDS b) de l'uranium (en jaune) et du phosphore (en vert), c) de l'uranium, d) du phosphore.

L'analyse des cartes de distribution des éléments par X-EDS a permis de déterminer que l'uranium était principalement localisé à la surface des cellules (Figure 67). Sur ces images, l'uranium est colocalisé avec le phosphore suggérant que l'uranium s'est adsorbé sur les groupes phosphates situés à la surface des cellules de O19 GR ND1 2. Néanmoins, ces cellules n'ont été ni fixées ni coupées au préalable des observations réalisées, empêchant de déterminer si l'uranium se trouve à l'intérieur de la cellule. Une observation de l'ultrastructure de cette souche par cryofixation à l'isopentane et cryocoupe a été réalisée par STEM/X-EDS pour tenter de répondre à ces interrogations. Cependant, la structure des bactéries s'est endommagée lors des étapes de cryofixation, ne permettant pas d'exploiter les images réalisées des cellules.

Ces résultats ont permis de déterminer que l'élimination de l'uranium par la souche O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp.*) est principalement liée à l'adsorption de l'uranium sur des groupes fonctionnels de la surface cellulaire de cette souche bactérienne. En effet, au pH fixé pour cette expérience (pH=7), les formes cationiques hydroxylées d'uranium ($(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ et $(\text{UO}_2)_4(\text{OH})_7^+$) sont dominantes (Figure 63), favorisant leur sorption sur la surface des cellules chargées négativement. Bien que les espèces de *Shewanella* soient connues pour leur capacité à réduire l'U(VI) dans des conditions anoxiques (Belli et al., 2015 ; Fredrickson et al., 2002 ;

Lovley et al., 1991 ; Wildung et al., 2000), plusieurs études ont également démontré que cette espèce pouvait entraîner une immobilisation de l'uranium par adsorption de celui-ci sur la surface cellulaire des souches de *Shewanella* étudiées (Huang et al., 2017 ; Nie et al., 2022 ; Sheng et Fein, 2014). Cependant, la biosorption de l'uranium est un phénomène indépendant des processus métaboliques des bactéries (Gadd, 2009 ; Kolhe et al., 2018 ; Lopez-Fernandez et al., 2021 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008 ; Shukla et al., 2017). Or, les différences d'élimination d'uranium observées entre les cellules vivantes et mortes signifient que l'activité microbienne joue un rôle important dans l'immobilisation de l'U(VI) par la souche O19 GR ND1 2. Les faibles concentrations en orthophosphate mesurées dans la solution en présence ou absence d'uranium, et l'absence de cristaux d'uranium au niveau extracellulaire ont confirmé que l'uranium n'est pas bioprécipité par cette souche dû à une libération d'orthophosphate à partir du β -glycérophosphate. Une hypothèse avancée serait que cette souche produit des substances polymériques extracellulaires (EPS), dont le rôle dans la biosorption ou la biominéralisation de l'uranium a déjà été démontré (Merroun et Selenska-Pobell, 2008). La contribution des EPS dans l'immobilisation de l'uranium par des espèces de *Shewanella* a également déjà été démontrée (Cao et al., 2011 ; Nie et al., 2022). Les EPS sont des produits métaboliques des bactéries, ce qui pourrait expliquer les différences d'élimination d'uranium observées entre les cellules vivantes et mortes. En particulier, Nie et al., (2022) avait observé une diminution de 22% de l'efficacité d'élimination après l'extraction des EPS de la souche *Shewanella putrefaciens*, ce qui est cohérent avec les différences d'élimination d'uranium observées entre les cellules vivantes et mortes dans le cadre de notre expérience (34%). De plus, les groupes phosphates des EPS ont déjà démontré leur implication dans la biosorption de l'uranium (Merroun et Selenska-Pobell, 2008 ; Nie et al., 2022), ce qui concorde avec les observations des cellules d'O19 GR ND1 2 où l'uranium était colocalisé avec le phosphore à la surface des cellules.

c) *Élimination de l'uranium par la souche A17 12 -22*

Les cellules de A17 12 -22 (*Serratia fonticola*) ont montré une élimination rapide de l'uranium après 1 jour d'incubation (80% d'uranium éliminé) (Figure 64). Le pourcentage d'uranium éliminé par cette souche augmente et atteint son maximum après 2 jours d'incubation (98% d'uranium éliminé) puis reste constant jusqu'au 3^{ème} jour d'incubation (97% d'uranium

éliminé) (Figure 64). Des taux similaires d'élimination d'uranium (supérieurs à 90%), en présence de β -glycérophosphate, ont également été observés pour des souches bactériennes isolées d'environnements riches en U (*Chryseobacterium sp. strain PMSZPI*, *Rahnella sp. Y9602*, *Leifsonia sp. J5* ; *Serratia sp. OT-II-7* et *Stenotrophomonas sp. BR8*) dans différentes conditions d'incubation (Beazley et al., 2007 ; Chandwadkar et al., 2018 ; Ding et al., 2018 ; Khare et al., 2020 ; Sánchez-Castro et al., 2020). Les cellules tuées par autoclave d'A17 12 -22 (*Serratia fonticola*) ont montré une élimination de 35% de l'uranium en solution après 3 jours (Figure 64), probablement due à une bioadsorption passive de l'uranium sur la surface chargée négativement des cellules de *Serratia* favorisée par la présence majoritaire de formes d'uranium chargées positivement à pH 7 ($(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$ et $(\text{UO}_2)_4(\text{OH})_7^+$). Ces résultats suggèrent que l'élimination de l'uranium par cette souche est liée à des processus passifs et actifs des cellules.

En parallèle, les cellules de la souche A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) ont montré leur capacité à libérer des ions orthophosphates en utilisant le β -glycérophosphate. Cette faculté est liée à l'activité phosphatase des cellules d'A17 12 -22 permettant l'hydrolyse du β -glycérophosphate et la libération d'ions phosphates solubles. Les espèces de *Serratia* sont connues pour exprimer une activité phosphatase en présence d'uranium, que ce soit dans des conditions acides ou alcalines (Chandwadkar et al., 2018 ; Newsome et al., 2015). En présence d'uranium, les cellules d'A17 12 -22 ont libéré ~5 fois moins d'orthophosphates ($360\mu\text{M}$) qu'en absence d'uranium ($1920\mu\text{M}$) après 1 jour d'incubation (Figure 65). En revanche, la quantité d'orthophosphate mesurée a augmenté à mesure que la concentration en uranium diminuait dans la solution. Après 3 jours d'incubation, la concentration en phosphate soluble n'était plus que ~2,5 fois supérieure en absence d'uranium ($3200\mu\text{M}$) qu'en présence d'uranium ($1200\mu\text{M}$). De plus, une fois le maximum d'uranium éliminé (après 2 jours) pour les cellules mises en contact avec l'uranium, la concentration en phosphate soluble mesurée a doublé ($580\mu\text{M}$ à t_{2j} et 1220 à t_{3j}). Les témoins abiotiques et les cellules tuées ont montré de très faibles valeurs d'orthophosphate libérées signifiant que très peu de phosphate était solubilisé à partir du β -glycérophosphate sans action des bactéries. Ces résultats démontrent que l'élimination d'uranium observée est liée à la capacité des cellules de la souche A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) à libérer des orthophosphates dans la solution. L'hypothèse émise est que ces ions phosphates libérés vont agir comme ligands pour l'uranium, entraînant la bioprécipitation de ce dernier sous forme de minéral de phosphate d'uranyle (Kolhe et al., 2018 ; Reitz et al., 2014 ; Sánchez-Castro et al., 2020).

Les cellules d'A17 12 -22 ont été observées en STEM/X-EDS afin de déterminer la localisation cellulaire de l'uranium précipité par cette bactérie pour élucider le mécanisme clé par lequel cette souche interagit avec l'uranium pour faire face à sa toxicité. Comme réalisée pour la souche O19 GR ND1 2, un dépôt direct des cellules sur la grille de carbone a été réalisé pour limiter les pertes d'uranium lors des étapes de fixation des cellules. Les images STEM et les spectres/cartes élémentaires obtenus sont présentés sur la Figure 68.

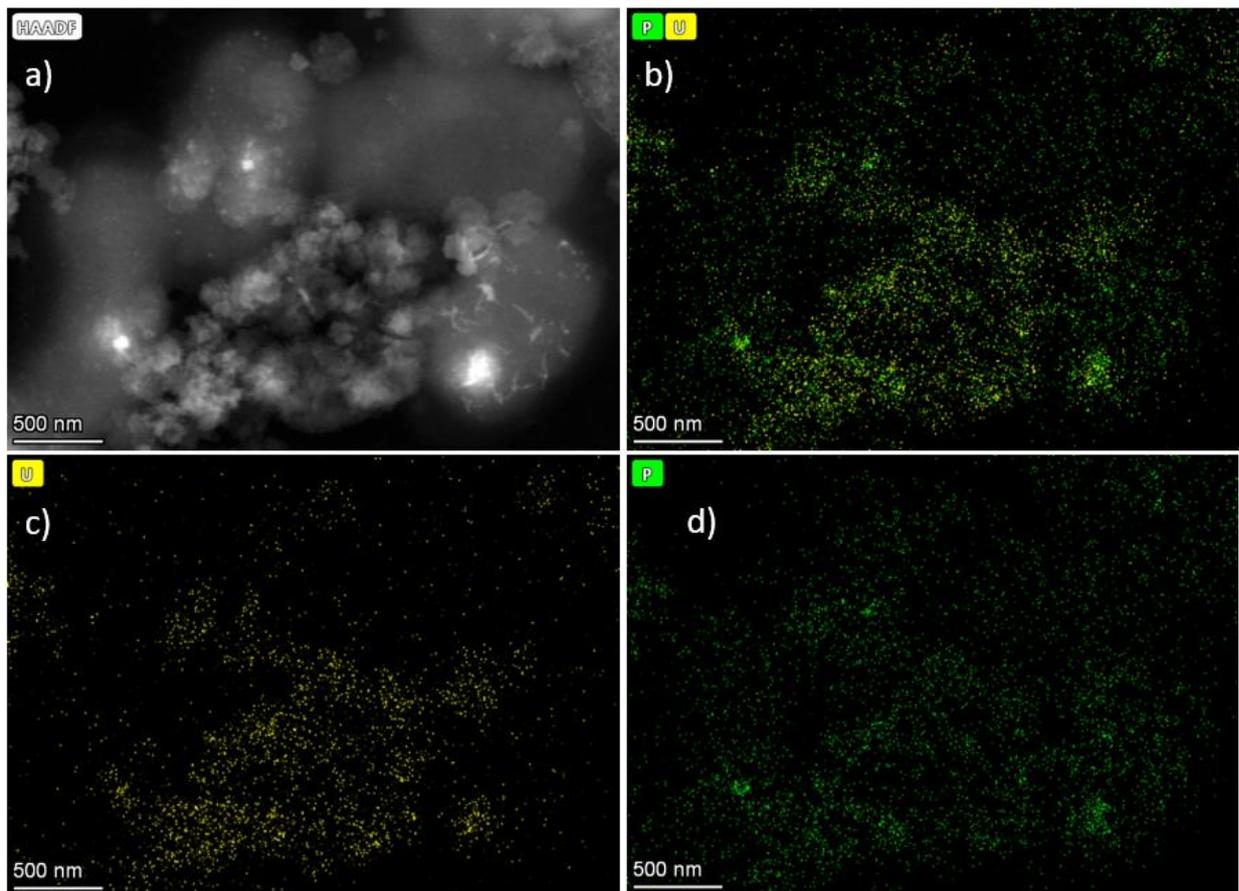


Figure 68 : Observation par microscopie électronique à transmission (en STEM-HAADF) a) de cellules d'A17 12 -22 déposées directement sur la grille de carbone après 3 jours en présence de 1mM de nitrate d'uranyle. Cartes de distribution par X-EDS b) de l'uranium (en jaune) et du phosphore (en vert), c) de l'uranium, d) du phosphore.

Les images STEM ont révélé la présence d'agglomérats denses situés à la surface des cellules ou autour des cellules. Ces observations ayant été réalisées sans fixation et coupe des échantillons, ces agglomérats sont principalement localisés à l'extérieur des cellules. En outre l'analyse de la cartographie élémentaire par X-EDS a révélé que les accumulations denses en électrons observées au niveau extracellulaire et à la surface des cellules sont composées principalement d'uranium et phosphore. La présence de phosphore dans l'espace extracellulaire est probablement liée à la localisation des enzymes phosphatases à ce niveau permettant, par

conséquent, la libération d'ions phosphates à partir du β -glycérophosphate (Chandwadkar et al., 2018 ; Sánchez-Castro et al., 2020). De plus, l'analyse X-EDS a révélé une colocalisation de l'uranium et du phosphore suggérant la complexation de l'uranium avec le phosphate.

Cependant, ces observations n'ont pas permis de déterminer l'ultrastructure des bactéries, ainsi que d'observer si l'uranium était accumulé à l'intérieur des cellules. Pour cela, les cellules d'A17 12 -22 ont été observées en STEM/X-EDS après cryofixation à l'isopentane et cryocoupe des échantillons. Les images STEM et les spectres/cartes élémentaires obtenus sont présentés sur la Figure 69.

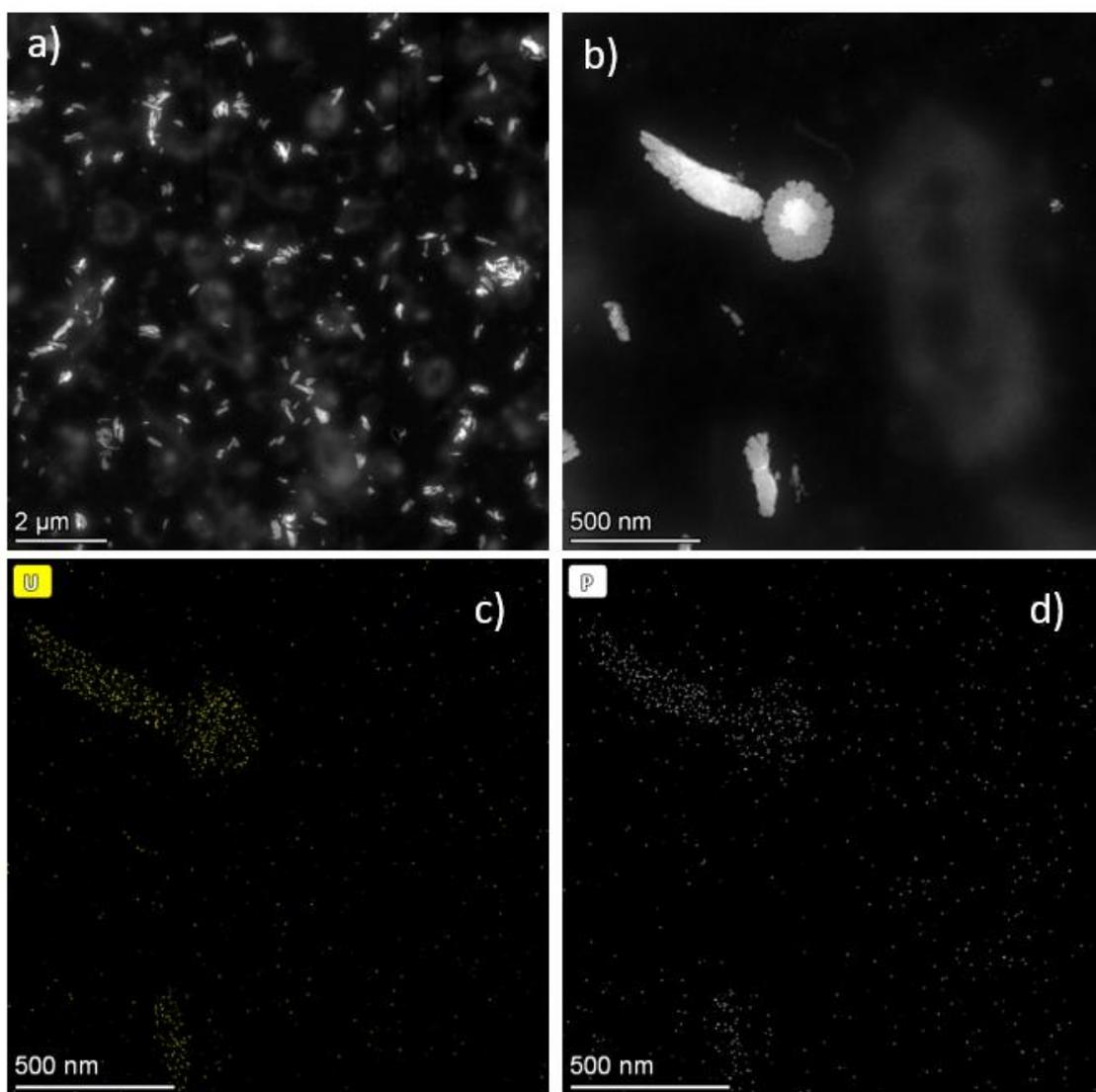


Figure 69 : Micrographie par STEM-HAADF d'une section mince a) de cellules d'A17 12 -22 après 3 jours en présence de 1mM de nitrate d'uranyle et b) d'une cellule zoomée. Cartes de distribution de la cellule zoomée par X-EDS c) de l'uranium (en jaune), d) du phosphore (en blanc).

L'analyse de ces images STEM a révélé la présence de précipités d'uranium denses, ressemblant à des cristaux. Ces précipités d'uranium sont en grande partie localisés dans l'espace extracellulaire, soit à la surface, soit autour des cellules. Comme observé précédemment, l'analyse X-EDS a confirmé que ces cristaux observés au niveau extracellulaire sont principalement composés d'uranium et de phosphore. Par conséquent, ces observations ont permis de confirmer que, de par son activité phosphatase, la souche A17 12 -22, appartenant à l'espèce *Serratia*, permet la libération d'orthophosphates dans le milieu par hydrolyse du β -glycérophosphate, qui vont interagir avec l'uranium entraînant sa précipitation sous forme de minéral de phosphate d'uranyle (par exemple autunite). Néanmoins, lors de cette dernière observation, après cryofixation, les bactéries n'ont pas été bien préservées, induisant des gonflements et destructions des cellules. Une alternative à une cryofixation par l'isopentane serait une cryofixation à haute pression comme réalisée dans l'étude de Isaure et al., (2020) et ayant démontré une bonne conservation de l'ultrastructure des cellules. De plus une analyse par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) des précipités d'uranium obtenus permettrait de définir précisément leur structure chimique.

De nombreuses études ont démontré que des bactéries environnementales isolées de sites enrichis ou contaminés en uranium précipitent l'uranium sous forme de phosphate d'uranyle en raison de leur activité phosphatase constitutive (Beazley et al., 2007 ; Martinez et al., 2007 ; Reitz et al., 2014 ; Sánchez-Castro et al., 2020), dont des espèces appartenant à *Serratia* (Chandwadkar et al., 2018 ; Newsome et al., 2015). En effet, Chandwadkar et al., (2018) ont démontré la forte contribution de la souche *Serratia sp. OT-II-7*, pour l'immobilisation de l'uranium par la formation de minéraux de phosphates d'uranyle, sur une large gamme de pH grâce à l'expression d'enzymes phosphatases acides et alcalines. Dans le cadre de notre expérience, il a été démontré que l'élimination de l'uranium par la souche A17 12 -22 est liée à des mécanismes passifs, basés sur la biosorption rapide de l'uranium à la surface cellulaire, et actifs, liés à la bioprécipitation de l'uranium due à la libération d'orthophosphates médiée par l'activité de la phosphatase. L'association de ces deux processus permettrait une forte élimination de l'uranium en solution par cette souche bactérienne (98% après 2 jours d'incubation). En effet, il a déjà été observé que la production seule d'une quantité significative de phosphatases ne permet pas une élimination importante de l'uranium (Chandwadkar et al., 2018). Une hypothèse proposée est que l'immobilisation de l'uranium par la souche A17 12 -22 est due à un processus biphasique complémentaire basé sur la biosorption de l'uranium à la surface des cellules qui ont fourni des sites de nucléation favorisant ensuite la

formation des minéraux de phosphates d'uranyle à la surface des cellules, due à la libération d'orthophosphate, liée à l'activité des phosphatases (Chandwadkar et al., 2018 ; Martínez-Rodríguez et al., 2023 ; Merroun et Selenska-Pobell, 2008). Enfin, l'avantage de la biominéralisation de l'uranium, comme observé pour la souche A17 12 -22 (*Serratia fonticola*), est que les précipités d'uranium résultant de celle-ci n'entraîneraient aucune altération de l'état redox de l'U(VI), contrairement à la précipitation effectuée par des bactéries bioréductrices en condition anaérobie où les minéraux d'uraninite formés sont connus pour être moins stables et facilement oxydables en forme U(VI) mobile par l'oxygène ou le nitrate (Huang et al., 2017 ; Kolhe et al., 2018 ; Martínez-Rodríguez et al., 2023 ; Newsome et al., 2015). De ce fait, l'immobilisation de l'uranium sous forme de minéraux phosphatés U(VI) dans des conditions aérobies peut être utilisée dans un contexte de bioremédiation pour atténuer les effets de l'uranium sur des sites contaminés pendant de longues périodes, sur une large gamme de pH, ces minéraux étant peu sensibles aux changements des conditions d'oxydation (Kolhe et al., 2018).

VI- Expérience préliminaire de bioremédiation à l'aide de la souche A17 12 -22

Bien que de nombreux travaux sur la bioremédiation microbienne de l'uranium se soient concentrés sur la bioréduction de l'uranium (VI) *in situ* par des bactéries réduisant le fer (III) ou par des bactéries sulfato-réductrices (Akob et al., 2008 ; Cardenas et al., 2008 ; Williams et al., 2013), le potentiel de biominéralisation de l'uranium sous forme de phosphate d'uranyle par des espèces bactériennes indigènes de sites contaminés en uranium, telle que la souche A17 12 -22, offre la stabilité du minéral produit dans l'environnement (Huang et al., 2017 ; Kolhe et al., 2018 ; Martínez-Rodríguez et al., 2023 ; Newsome et al., 2015). Cependant, il est important au préalable d'observer le potentiel de la souche A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) pour éliminer l'uranium dans des conditions environnementales. En effet, comme observé dans la partie précédente, cette souche bactérienne est capable d'éliminer 98% d'uranium dans une solution aqueuse, en présence d'une source de phosphate organique dans un milieu simple. Il s'agit désormais d'observer si cette souche bactérienne est capable d'éliminer l'uranium dans des conditions environnementales. Pour tester cette hypothèse, la souche bactérienne a été mise en contact avec 1mM de nitrate d'uranyle ajouté dans de l'eau

du ruisseau (Le Gourgeat) situé à l'aval de l'ancien site minier de Rophin, d'où cette souche a été isolée, avec une source de phosphate organique (β -glycérophosphate). L'expérience a été réalisée en batch à pH 7 pendant 4 jours à 30°C. Les cellules ont été inoculées dans la solution à une densité optique initiale de 0,5. Le pourcentage d'élimination de l'uranium (en rouge) et la concentration en PO_4^{3-} (en bleu) ont été suivis sur 4 jours par mesure spectrophotométrique (Figure 70).

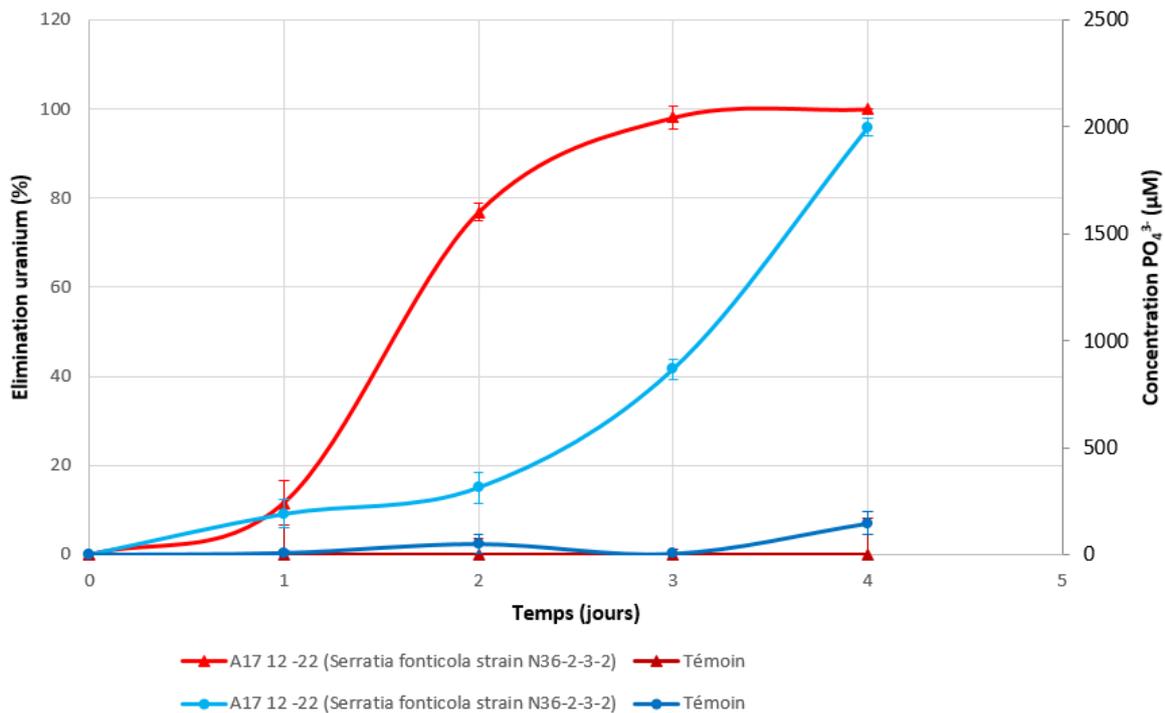


Figure 70 : Pourcentage d'élimination d'uranium (en rouge) et concentration en PO_4^{3-} (en bleu) mesurées dans l'eau prélevée du site de Rophin après exposition des cellules d'A17 12 -22 à 1mM de nitrate d'uranyle en présence de β -glycérophosphate à pH 7 pendant 4 jours

Les cellules de la souche A17 12 -22 (*Serratia fonticola*) ont permis l'élimination de la totalité de l'uranium dans la solution après 4 jours d'incubation. La concentration en orthophosphate mesurée a augmenté fortement à partir du 3^{ème} jour, jusqu'à atteindre une concentration de $1998 \pm 41 \mu\text{M}$ après 4 jours d'incubation. Les concentrations mesurées en présence de cellules vivantes étaient significativement supérieures à celles mesurées dans le témoin abiotique, signifiant que cette libération d'orthophosphate est liée au métabolisme de la souche A17 12 -22. Comme observé dans l'expérience précédente, les cellules de la souche A17 12 -22 libèrent des ions orthophosphates, à partir du β -glycérophosphate, grâce à l'activité des phosphatases de cette souche. Cependant, le processus d'élimination est plus lent et n'est

observable significativement qu'à partir du 2^{ème} jour d'incubation, avec une forte concentration en phosphate soluble mesurée à partir du 3^{ème} jour. De nombreux ligands, organiques et inorganiques, présents dans les eaux douces de surface, peuvent se complexer avec l'U(VI) comme les sulfates, les phosphates, les nitrates, la matière organique dissoute et les oxydes de fer et de manganèse (Cumberland et al., 2016 ; Markich, 2002 ; Stubbs et al., 2006). En particulier, les carbonates sont des agents complexants importants pour l'uranium dans les eaux douces de surfaces oxiques, telles que l'eau du ruisseau du Gourgeat prélevée à l'aval du site minier de Rophin et utilisée comme matrice pour cette expérience (Markich et al., 2002). En présence d'un excès de carbonates, entraînant la formation de complexes de carbonates d'uranyle très solubles, il est difficile de précipiter l'uranium sous forme de phosphate d'uranyle (Chandwadkar et al., 2018). La précipitation n'est possible qu'à des valeurs de $\log(\text{PO}_4^{3-} / \text{CO}_3^{2-})$ supérieurs à -3 (Chandwadkar et al., 2018 ; Rogiers et al., 2022). De ce fait, dans le cadre de cette expérience, la souche A17 12 -22 doit libérer une quantité de phosphate plus importante pour entraîner la précipitation de l'uranium sous forme de minéral de phosphate d'uranyle. Ceci explique un processus d'élimination de l'uranium plus lent contrairement à l'expérience précédente réalisée dans une solution simple sans ligands organiques ou inorganiques.

Bien que cette expérience soit très préliminaire, la souche A17 12 -22 a démontré la capacité à immobiliser une forte concentration d'uranium dans une eau douce de surface naturelle par ajout d'un substrat organo-phosphaté. En effet, la contribution des phosphatases d'un isolat indigène à la précipitation de l'uranium dans des conditions environnementales est pertinente pour la conception de stratégies de bioremédiation *in situ* de l'uranium. Des travaux futurs pourraient inclure des expériences en colonne appliquées à des eaux réellement contaminées en uranium pour mieux déterminer les performances du processus de biominéralisation de cette souche dans des conditions environnementales. En outre, comme le phosphate de glycérol peut ne pas être rentable pour la biominéralisation de par son coût élevé (Newsome et al., 2014), l'utilisation d'autres sources de phosphates organiques par la souche A17 12 -22 pourrait être étudiées.

VII- Conclusion

Les bactéries présentes dans des sites enrichis ou contaminés en uranium sont connues pour avoir développé des réponses métaboliques pour garantir leur survie dans de tels environnements. En effet, plusieurs souches isolées des sources minérales radioactives et du site de Rophin ont montré une résistance à l'uranium ainsi que la capacité à interagir avec l'uranium, permettant son immobilisation. En particulier, les 6 souches bactériennes étudiées (O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp.*), O19 DO -1 2 16 (*Pseudomonas*), S20 SAB -1 1 3 (*Aeromonas salmonicida*), A17 12 -22 (*Serratia fonticola*), A17 51 -24 (*Pseudomonas sp.*) et A17 N3 ND1 16 (*Pseudomonas jessenii*)) ont montré une élimination de l'uranium, variant de 64% à 79%, dans une solution de NaCl (0,9%) à pH 4 pour une concentration initiale d'uranium de 100 μ M. Cette élimination rapide de l'uranium a été assignée à un mécanisme passif des bactéries basé sur l'adsorption du cation uranyle sur les groupes fonctionnels chargés négativement de la surface cellulaire de ces bactéries. Pour certaines souches, un second mécanisme actif était également impliqué dans l'élimination de l'uranium et probablement lié à une bioaccumulation de l'uranium à l'intérieur des cellules. Des expériences complémentaires sont encore nécessaires pour affiner ces aspects du processus (Observation STEM/X-EDS après cryofixation et cryocoupe, et analyse FTIR).

D'autre part, les souches O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) et A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*), exposées à 1mM d'uranium en présence d'une source de phosphate organique (β -glycérophosphate) dans un tampon MOPS (pH 7), ont montré une forte élimination de l'uranium après 3 jours d'incubation (respectivement 87% et 98%). Pour la souche O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*), le mécanisme d'élimination de l'uranium semble principalement lié à l'adsorption de l'uranium à la surface des cellules. Une hypothèse avancée serait que l'uranium pourrait se fixer sur les EPS sécrétés par cette souche. Les observations en STEM/X-EDS confirment la présence d'uranium principalement à la surface des cellules, et corrélée à la présence de phosphates potentiellement présent dans les EPS. Enfin, pour la souche A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*), l'activité phosphatase de cette bactérie a permis l'hydrolyse du β -glycérophosphate, entraînant la libération d'orthophosphate dans la solution. L'orthophosphate libéré peut ensuite interagir avec l'uranium et provoque la précipitation de l'uranium sous forme de minéral de phosphate d'uranyle. Les observations STEM/X-EDS des cellules ont confirmé la présence extracellulaire

d'uranium sous forme de cristaux, et corrélé au phosphore. En outre, la formation extracellulaire de minéraux de phosphate d'uranyle semble être favorisée par la biosorption primaire de l'uranium à la surface des cellules fournissant des sites de nucléation.

En conclusion, ces résultats démontrent que parmi les communautés bactériennes indigènes présentes dans les deux sites étudiés (sources minérales et site de Rophin), plusieurs souches bactériennes sont impliquées dans la biogéochimie de l'uranium. En effet, ces souches bactériennes mettent en place différents mécanismes leur permettant d'interagir avec l'uranium. Ces interactions conduisent à l'immobilisation de ce dernier, réduisant sa biodisponibilité, et par conséquent, sa toxicité. Enfin, comme observé pour la souche A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*), ces différentes bactéries pourraient être utilisées dans un contexte de bioremédiation de l'uranium de sites contaminés.

Conclusion générale et Perspectives

1) Conclusion générale

En résumé, les travaux présentés dans cette thèse ont contribué à une meilleure caractérisation et compréhension des communautés bactériennes présentes dans des environnements définis par une radioactivité d'origine naturelle (NORM), mais également renforcée par des activités humaines (TENORM). A ce jour, bien que de nombreuses études aient caractérisé les communautés bactériennes présentes dans des environnements riches en radioéléments dus à des activités humaines, très peu se sont intéressés à des environnements définis par de fortes concentrations en radioéléments d'origine naturelle. Pourtant, les communautés bactériennes exposées à des niveaux élevés et chroniques de radioactivité d'origine naturelle, sur de très longues périodes, comme dans les sources minérales naturellement radioactives, pourraient conduire à une sélection de populations bactériennes spécifiques adaptées à ces conditions extrêmes.

Ainsi, la première partie de ce travail s'est concentrée sur la description des communautés bactériennes présentes dans les sédiments de 5 sources minérales naturellement radioactives (situées dans le Massif Central en Auvergne), présentant des conditions physicochimiques variées. La caractérisation physicochimique de ces 5 sources minérales (Dourieux, Montagne, Gravier, 3 Sauts et Bard) échantillonnées lors de deux campagnes de prélèvements (octobre 2019 et juin 2020) a permis de montrer que ces sources présentaient des profils physicochimiques différents et représentaient des biotopes distincts. Deux sources (Montagne et Dourieux) se distinguent par de fortes concentrations/activités en radioéléments (principalement ^{222}Rn , U et Th). De plus, l'analyse par métabarcoding des communautés bactériennes a permis d'observer que chaque source était caractérisée par des populations de bactéries spécifiques à chacune, qui ont évolué en fonction de la saison, liées aux paramètres physicochimiques propres à chacune d'entre elles. En particulier, les sources minérales de Dourieux et Montagne, présentant de fortes concentrations en radioéléments, sont caractérisées par des populations bactériennes bien distinctes par rapport aux autres sources. En outre, certaines des OTUs spécifiques à ces deux sources étaient corrélées aux fortes concentrations en radioéléments (U, Th et ^{222}Rn) mesurées dans celles-ci.

La deuxième partie de ce travail était axée sur la caractérisation des communautés bactériennes le long d'une carotte de sol prélevée dans une zone humide à l'aval de l'ancien

site minier de Rophin. Ces travaux ont contribué à observer si la radioactivité renforcée par des activités humaines (TENORM) ont influencé les communautés de bactéries exposées à cette radioactivité depuis quelques décennies, contrairement aux sources minérales où les populations bactériennes ont été exposées à une radioactivité naturelle pendant des milliers d'années. L'analyse par métabarcoding des communautés bactériennes le long de cette carotte a permis de confirmer que les radionucléides apportés par cette contamination ont influencé la structure et la diversité de ces communautés bactériennes, en particulier dans la couche caractérisée par de fortes concentrations en uranium. Cette couche de sol était caractérisée par des OTUs spécifiques par rapport aux autres couches de sol, dont certaines se sont révélées corrélées aux fortes concentrations en uranium mesurées dans celle-ci.

Ces deux études ont permis de déterminer que des OTUs spécifiques des sources minérales les plus radioactives (Dourieux et Montagne) et de la couche de sol marquée par de fortes concentrations en uranium dues aux activités minières (couche ZB), présentent des corrélations fortes avec les concentrations en radioéléments mesurées dans ces environnements. Ceci suggère que la présence de ces radioéléments, notamment l'uranium, a entraîné une sélection d'espèces bactériennes capables de se développer dans ces conditions particulières. Plusieurs OTUs identifiées pourraient intervenir dans la biogéochimie des métaux et radioéléments présents dans ces deux environnements. En particulier, pour ces deux sites, des co-corrélations entre des bactéries sulfato et/ou ferro réductrices et de bactéries fermentaires avec les fortes concentrations en uranium mesurées, reflètent des associations de bactéries remplissant des fonctions complémentaires permettant leur croissance dans ces environnements particuliers. En effet, ces bactéries sulfato et/ou ferro réductrices sont capables de bioréduire l'uranium, réduisant sa toxicité pour les autres communautés bactériennes et favorisant, par conséquent, leur croissance. D'autres part, les bactéries fermentaires peuvent libérer des sources de carbone organique utilisées comme donneurs d'électrons par les bactéries sulfato/ferro réductrices, favorisant leur développement et, par conséquent, la bioréduction de l'uranium dans ces environnements.

Par conséquent, il est apparu intéressant d'étudier certaines des bactéries présentes dans ces environnements afin de comprendre les mécanismes d'interactions mis en place avec l'uranium leur permettant de se développer dans ces conditions particulières dans les deux sites étudiés. Plusieurs souches isolées de ces deux sites sont apparues comme étant de bonnes candidates pour étudier les mécanismes d'interaction avec l'uranium. Après avoir exposé certaines souches bactériennes à l'uranium, plusieurs ont montré une résistance à l'uranium ainsi que la capacité

à interagir avec cet élément, permettant son immobilisation. En particulier, deux souches bactériennes, O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) et A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) ont montré une capacité à éliminer l'uranium en solution. Les observations en STEM/X-EDS ont permis de supposer que la première souche (O19 GR ND1 2) éliminait l'uranium principalement par biosorption, alors que la deuxième souche (A17 12 -22) biominéralisait l'uranium grâce à la libération d'orthophosphates à partir d'une source de phosphate organique, médiée par son activité phosphatase.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis d'apporter des informations sur les communautés bactériennes peuplant des environnements radioactifs d'origine naturelle ou anthropisée. Cependant, ces travaux ne représentent qu'une première étape dans la compréhension de ces écosystèmes complexes et de nombreuses questions nécessiteraient d'être approfondies

2) Perspectives

Ayant constaté que les concentrations en radioéléments sont corrélées à des populations spécifiques des sources minérales les plus radioactives et de la couche de sol définie par de fortes concentrations en uranium, il serait intéressant désormais d'étudier au sein de ces deux environnements, quelles sont les fonctions bactériennes principales trouvées. En effet, bien qu'il ait été déterminé que des associations de bactéries remplissant des fonctions similaires ou complémentaires leur permettraient de se développer dans ces environnements radioactifs, ces fonctions restent putatives par l'analyse en métabarcoding. De ce fait, des travaux futurs d'analyse par métagénomique non ciblée permettraient d'étudier le métagénome des échantillons de ces deux environnements. Cette méthode permettrait de décrire le fonctionnement global des communautés bactériennes dans ces deux environnements, et d'identifier les organismes clés et leur fonctions primaires dans ces environnements extrêmes. En particulier, un focus pourrait être réalisé sur les fonctions impliquées des communautés bactériennes dans la spéciation et la résistance à l'uranium (transporteurs, sidérophores, cytochromes C). Cette analyse a été effectuée dans le cadre de l'étude sur la carotte de Rophin, et les résultats sont attendus pour nous permettre d'étudier quelles sont les fonctions bactériennes globales présentes dans ce site.

D'autre part, il serait particulièrement enrichissant d'approfondir les études d'interaction bactéries – uranium afin de déterminer finement ces processus d'interaction avec des méthodes analytiques complémentaires. Par exemple, les groupes fonctionnels des souches bactériennes impliqués dans la biosorption de l'uranium pourraient être recherchés par spectroscopie infrarouge (FTIR) afin de mieux comprendre ces phénomènes d'adsorption passifs de l'uranium à la surface cellulaire des souches bactériennes étudiées. En outre, l'analyse de la structure chimique des précipités d'uranium obtenues par spectrométrie d'absorption des rayons X (XAS) permettrait de confirmer si les précipités d'uranium observés sont liés à une complexation entre l'uranium et les ions orthophosphates libérés par la souche A17 12 -22 par son activité phosphatase. Il serait également pertinent d'identifier les gènes impliqués dans les mécanismes d'interaction et/ou de résistance des souches étudiées avec l'uranium. Cette étude permettrait de confirmer, d'un point de vue génétique, les mécanismes métaboliques mis en place par les souches O19 GR ND1 2 (*Shewanella sp. strain A16OP11*) et A17 12 -22 (*Serratia fonticola strain N36-2-3-2*) pour éliminer l'uranium en solution. Pour cela, des gènes connus dans la résistance des bactéries à l'uranium pourront être ciblés par PCR quantitative afin de caractériser le niveau d'expression génique de ces gènes après exposition des souches à l'uranium. Une analyse par métatranscriptomique après exposition de ces souches à l'uranium permettrait également de déterminer plus précisément quelles sont les gènes impliqués dans la résistance et les mécanismes d'interaction de ces souches avec l'uranium. Ces gènes pourraient, par la suite, être utilisés comme indicateurs de l'influence de l'uranium sur des communautés bactériennes indigènes en ciblant l'expression de ces gènes *in situ* par PCR à transcriptase inverse quantitative (RT-PCR quantitative) dans des environnements enrichis ou contaminés en uranium. Enfin, le potentiel de ces souches bactériennes à éliminer l'uranium pourrait être exploré dans un contexte de bioremédiation de l'uranium dans des environnements contaminés.

Bibliographie

- Abatenh, Endeshaw, Birhanu Gizaw, Zerihun Tsegaye, Misganaw Wassie, Endeshaw Abatenh, Birhanu Gizaw, Zerihun Tsegaye, et Misganaw Wassie. « The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review ». *Open Journal of Environmental Biology* 2, n° 1 (10 novembre 2017): 038-046. <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>.
- Abbas, Syed Zaghum, Mehwish Riaz, Naseem Ramzan, M. Tariq Zahid, Farah R. Shakoori, et Mohd. Rafatullah. « Isolation and Characterization of Arsenic Resistant Bacteria from Wastewater ». *Brazilian Journal of Microbiology* 45, n° 4 (décembre 2014): 1309-15. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400022>.
- Abdelouas, A. « Uranium Mill Tailings: Geochemistry, Mineralogy, and Environmental Impact ». *Elements* 2, n° 6 (1 décembre 2006): 335-41. <https://doi.org/10.2113/gselements.2.6.335>.
- Abdelouas, A., Yongming Lu, W. Lutze, et H. E. Nuttall. « Reduction of U(VI) to U(IV) by Indigenous Bacteria in Contaminated Ground Water ». *Journal of Contaminant Hydrology* 35, n° 1 (15 décembre 1998): 217-33. [https://doi.org/10.1016/S0169-7722\(98\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S0169-7722(98)00134-X).
- Acharya, Celin. « Uranium Bioremediation: Approaches and Challenges ». In *Environmental Microbial Biotechnology*, édité par Lala Behari Sukla, Nilotpala Pradhan, Sandeep Panda, et Barada Kanta Mishra, 45:119-32. Soil Biology. Cham: Springer International Publishing, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19018-1_7.
- Acharya, Celin, et Shree Kumar Apte. « Insights into the Interactions of *Cyanobacteria* with Uranium ». *Photosynthesis Research* 118, n° 1-2 (novembre 2013): 83-94. <https://doi.org/10.1007/s1120-013-9928-9>.
- Adiguzel, Ahmet, Hakan Ozkan, Ozlem Baris, Kadriye Inan, Medine Gulluce, et Fikretin Sahin. « Identification and Characterization of Thermophilic Bacteria Isolated from Hot Springs in Turkey ». *Journal of Microbiological Methods* 79, n° 3 (décembre 2009): 321-28. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.026>.
- Agarwal, Meenakshi, Ashish Pathak, Rajesh Rathore, Om Prakash, Rakesh Singh, Rajneesh Jaswal, John Seaman, et Ashvini Chauhan. « Proteogenomic Analysis of *Burkholderia* Species Strains 25 and 46 Isolated from Uraniferous Soils Reveals Multiple Mechanisms to Cope with Uranium Stress ». *Cells* 7, n° 12 (12 décembre 2018): 269. <https://doi.org/10.3390/cells7120269>.
- Agarwal, Meenakshi, Rajesh Singh Rathore, et Ashvini Chauhan. « A Rapid and High Throughput MIC Determination Method to Screen Uranium Resistant Microorganisms ». *Methods and Protocols* 3, n° 1 (3 mars 2020): 21. <https://doi.org/10.3390/mps3010021>.
- Ahmed, Bulbul, Bin Cao, Jeffrey S. McLean, Tuba Ica, Alice Dohnalkova, Ozlem Istanbulu, Akin Paksoy, Jim K. Fredrickson, et Haluk Beyenal. « Fe(III) Reduction and U(VI) Immobilization by *Paenibacillus* sp. Strain 300A, Isolated from Hanford 300A Subsurface Sediments ». *Applied and Environmental Microbiology* 78, n° 22 (novembre 2012): 8001-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.01844-12>.
- Akob, Denise M., Tsing Bohu, Andrea Beyer, Franziska Schäffner, Matthias Händel, Carol A. Johnson, Dirk Merten, Georg Büchel, Kai Uwe Totsche, et Kirsten Küsel. « Identification of Mn(II)-Oxidizing Bacteria from a Low-pH Contaminated Former Uranium Mine ». *Applied and Environmental Microbiology* 80, n° 16 (août 2014): 5086-97. <https://doi.org/10.1128/AEM.01296-14>.
- Akob, Denise M., Heath J. Mills, Thomas M. Gihring, Lee Kerkhof, Joseph W. Stucki, Alexandre S. Anastácio, Kuk-Jeong Chin, et al. « Functional Diversity and Electron

- Donor Dependence of Microbial Populations Capable of U(VI) Reduction in Radionuclide-Contaminated Subsurface Sediments ». *Applied and Environmental Microbiology* 74, n° 10 (15 mai 2008): 3159-70. <https://doi.org/10.1128/AEM.02881-07>.
- Ali, Nida, Narjes Dashti, Dina Al-Mailem, Mohamed Eliyas, et Samir Radwan. « Indigenous Soil Bacteria with the Combined Potential for Hydrocarbon Consumption and Heavy Metal Resistance ». *Environmental Science and Pollution Research* 19, n° 3 (1 mars 2012): 812-20. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0624-z>.
- Alsac, C, D D'Arcy, R Souiller, J Féraud, D Giot, et M Jeambrun. « NOTICE EXPLICATIVE DE LA FEUILLE AIGUEPERSE A 1/50 000 », s. d., 64.
- Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, et David J. Lipman. « Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs ». *Nucleic Acids Research* 25, n° 17 (1 septembre 1997): 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Anderson, Robert T., Helen A. Vrionis, Irene Ortiz-Bernad, Charles T. Resch, Philip E. Long, Richard Dayvault, Ken Karp, et al. « Stimulating the In Situ Activity of *Geobacter* Species To Remove Uranium from the Groundwater of a Uranium-Contaminated Aquifer ». *Applied and Environmental Microbiology* 69, n° 10 (octobre 2003): 5884-91. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5884-5891.2003>.
- Andrew, David R., Robert R. Fitak, Adrian Munguia-Vega, Adriana Racolta, Vincent G. Martinson, et Katerina Dontsova. « Abiotic Factors Shape Microbial Diversity in Sonoran Desert Soils ». *Applied and Environmental Microbiology* 78, n° 21 (novembre 2012): 7527-37. <https://doi.org/10.1128/AEM.01459-12>.
- Anitori, Roberto P., Cherida Trott, David J. Saul, Peter L. Bergquist, et Malcolm R. Walter. « A Culture-Independent Survey of the Bacterial Community in a Radon Hot Spring ». *Astrobiology* 2, n° 3 (août 2002): 255-70. <https://doi.org/10.1089/153110702762027844>.
- Arnold, Thuro, Nils Baumann, Evelyn Krawczyk-Bärsch, Sina Brockmann, Udo Zimmermann, Ulf Jenk, et Stephan Weiß. « Identification of the Uranium Speciation in an Underground Acid Mine Drainage Environment ». *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, n° 8 (avril 2011): 2200-2212. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.01.037>.
- Arroyo-Herrera, Ivan, Brenda Román-Ponce, Ana Laura Reséndiz-Martínez, Paulina Estrada-de los Santos, En Tao Wang, et María Soledad Vásquez-Murrieta. « Heavy-Metal Resistance Mechanisms Developed by Bacteria from Lerma–Chapala Basin ». *Archives of Microbiology* 203, n° 4 (1 mai 2021): 1807-23. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02140-2>.
- Baker, Lory-Anne, David G. Biron, Fanny Millan, Olivier Voltaire, Vincent Breton, Elisabeth Allain, Carlos E. Wetzel, Luc Ector, et Aude Beauger. « The Substrate, a Key Factor or Not, to Explain the Species Diversity of Diatom Communities in Mineral Springs ». *Botany Letters* 169, n° 2 (3 avril 2022): 155-65. <https://doi.org/10.1080/23818107.2022.2028186>.
- Beaucaire, C., A. Criaud, and G. Michard. 1987. “Contrôle des concentrations de certains éléments trace (As, Sb, Ge, U, Ra, Ba) dans les eaux du Cézallier (Massif Central, France).” [Controlling the concentrations of certain trace elements (As, Sb, Ge, U, Ra, Ba) in the waters of Cézallier (Massif Central, France)]. *Chemical Geology* 63 (1–2): 85–99. doi: 10.1016/0009-2541(87)90076-3
- Beauger, Aude, Carlos E. Wetzel, Elisabeth Allain, Clotilde Bertin, Olivier Voltaire, Vincent Breton, Lory-Anne Baker, Sofia Kolovi, David Biron, et Luc Ector. « *Chamaepinnularia Salina* (Bacillariophyta), a New Diatom Species from French Mineral Springs (Massif Central) ». *Phytotaxa* 538, n° 1 (3 mars 2022): 55-73.

- <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.538.1.5>.
- Beauger, Aude, Carlos E. Wetzel, Olivier Voldoire, et Luc Ector. « *Pseudostaurosira bardii* (Fragilariaceae, Bacillariophyta), a new species from a saline hydrothermal spring of the Massif Central (France) ». *Botany Letters* 166, n° 1 (2018): 3-13. <https://doi.org/10.1080/23818107.2018.1460278>.
- Beazley, Melanie J., Robert J. Martinez, Patricia A. Sobecky, Samuel M. Webb, et Martial Taillefert. « Uranium Biomineralization as a Result of Bacterial Phosphatase Activity: Insights from Bacterial Isolates from a Contaminated Subsurface ». *Environmental Science & Technology* 41, n° 16 (août 2007): 5701-7. <https://doi.org/10.1021/es070567g>.
- Belli, Keaton M., Thomas J. DiChristina, Philippe Van Cappellen, et Martial Taillefert. « Effects of Aqueous Uranyl Speciation on the Kinetics of Microbial Uranium Reduction ». *Geochimica et Cosmochimica Acta* 157 (15 mai 2015): 109-24. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.02.006>.
- Beneš, P., K. Kratzer, Š. Vlčková, et E. Šebestová. « Adsorption of Uranium on Clay and the Effect of Humic Substances ». *Radiochimica Acta* 82, n° s1 (1 janvier 1998). <https://doi.org/10.1524/ract.1998.82.special-issue.367>.
- Benyehuda, G, J Coombs, P L Ward, D Balkwill, et T Barkay. « Metal resistance among aerobic chemoheterotrophic bacteria from the deep terrestrial subsurface ». *Canadian Journal of Microbiology* 49, n° 2 (février 2003): 151-56. <https://doi.org/10.1139/w03-012>.
- Bernhard, G, G Geipel, V Brendler, et H Nitsche. « Uranium Speciation in Waters of Different Uranium Mining Areas ». *Journal of Alloys and Compounds* 271-273 (juin 1998): 201-5. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(98\)00054-1](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(98)00054-1).
- Bondici, V.f., J.r. Lawrence, N.h. Khan, J.e. Hill, E. Yergeau, G.m. Wolfaardt, J. Warner, et D.r. Korber. « Microbial Communities in Low Permeability, High PH Uranium Mine Tailings: Characterization and Potential Effects ». *Journal of Applied Microbiology* 114, n° 6 (2013): 1671-86. <https://doi.org/10.1111/jam.12180>.
- Bondici, V.F., J.R. Lawrence, N.H. Khan, J.E. Hill, E. Yergeau, G.M. Wolfaardt, J. Warner, et D.R. Korber. « Microbial Communities in Low Permeability, High PH Uranium Mine Tailings: Characterization and Potential Effects ». *Journal of Applied Microbiology* 114, n° 6 (juin 2013): 1671-86. <https://doi.org/10.1111/jam.12180>.
- Boucher, Delphine, Ludwig Jardillier, et Didier Debroas. « Succession of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir ». *FEMS Microbiology Ecology* 55, n° 1 (1 janvier 2006): 79-97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00011.x>.
- Bresson, Carole, Eric Ansoborlo, et Claude Vidaud. « Radionuclide Speciation: A Key Point in the Field of Nuclear Toxicology Studies ». *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26, n° 3 (2011): 593-601. <https://doi.org/10.1039/C0JA00223B>.
- Brodie, Eoin L., Todd Z. DeSantis, Dominique C. Joyner, Seung M. Baek, Joern T. Larsen, Gary L. Andersen, Terry C. Hazen, et al. « Application of a High-Density Oligonucleotide Microarray Approach To Study Bacterial Population Dynamics during Uranium Reduction and Reoxidation ». *Applied and Environmental Microbiology* 72, n° 9 (septembre 2006): 6288-98. <https://doi.org/10.1128/AEM.00246-06>.
- Brzoska, Ryann M., Richard E. Edelman, et Annette Bollmann. « Physiological and Genomic Characterization of Two Novel *Bacteroidota* Strains *Asinibacterium* Spp. OR43 and OR53 ». *Bacteria* 1, n° 1 (8 février 2022): 33-47. <https://doi.org/10.3390/bacteria1010004>.
- Burg, Bertus van den. « Extremophiles as a Source for Novel Enzymes ». *Current Opinion in Microbiology* 6, n° 3 (1 juin 2003): 213-18. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00060-2).

- Cao, Bin, Bulbul Ahmed, David W. Kennedy, Zheming Wang, Liang Shi, Matthew J. Marshall, Jim K. Fredrickson, Nancy G. Isern, Paul D. Majors, et Haluk Beyenal. « Contribution of Extracellular Polymeric Substances from *Shewanella* sp. *HRCR-1* Biofilms to U(VI) Immobilization ». *Environmental Science & Technology* 45, n° 13 (1 juillet 2011): 5483-90. <https://doi.org/10.1021/es200095j>.
- Cao, Kim-Anh Lê, Debra Rossouw, Christèle Robert-Granié, et Philippe Besse. « A Sparse PLS for Variable Selection When Integrating Omics Data ». *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 7, n° 1 (18 novembre 2008). <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1390>.
- Cardenas, Erick, Wei-Min Wu, Mary Beth Leigh, Jack Carley, Sue Carroll, Terry Gentry, Jian Luo, et al. « Microbial Communities in Contaminated Sediments, Associated with Bioremediation of Uranium to Submicromolar Levels ». *Applied and Environmental Microbiology* 74, n° 12 (juin 2008): 3718-29. <https://doi.org/10.1128/AEM.02308-07>.
- Cardenas, Erick, Wei-Min Wu, Mary Beth Leigh, Jack Carley, Sue Carroll, Terry Gentry, Jian Luo, et al. « Significant Association between Sulfate-Reducing Bacteria and Uranium-Reducing Microbial Communities as Revealed by a Combined Massively Parallel Sequencing-Indicator Species Approach ». *Applied and Environmental Microbiology* 76, n° 20 (15 octobre 2010): 6778-86. <https://doi.org/10.1128/AEM.01097-10>.
- Carvajal, Denny A., Yelena P. Katsenovich, et Leonel E. Lagos. « The Effects of Aqueous Bicarbonate and Calcium Ions on Uranium Biosorption by *Arthrobacter G975* Strain ». *Chemical Geology* 330-331 (novembre 2012): 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2012.08.018>.
- Casanova, Joël, Françoise Bodéan, Philippe Négrel, et Mohamed Azaroual. « Microbial Control on the Precipitation of Modern Ferrihydrite and Carbonate Deposits from the Cézallier Hydrothermal Springs (Massif Central, France) ». *Sedimentary Geology* 126, n° 1-4 (juillet 1999): 125-45. [https://doi.org/10.1016/S0037-0738\(99\)00036-6](https://doi.org/10.1016/S0037-0738(99)00036-6).
- Chabalala, Simphiwe, et Evans M.N. Chirwa. « Removal of Uranium(VI) under Aerobic and Anaerobic Conditions Using an Indigenous Mine Consortium ». *Minerals Engineering* 23, n° 6 (mai 2010): 526-31. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2010.01.012>.
- Chanal, Angélique, Virginie Chapon, Karim Benzerara, Mohamed Barakat, Richard Christen, Wafa Achouak, Frédéric Barras, et Thierry Heulin. « The Desert of Tataouine: An Extreme Environment That Hosts a Wide Diversity of Microorganisms and Radiotolerant Bacteria ». *Environmental Microbiology* 8, n° 3 (2006): 514-25. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00921.x>.
- Chandwadkar, Pallavi. « Uranium Biomineralization Induced by a Metal Tolerant *Serratia* Strain under Acid, Alkaline and Irradiated Conditions », 2018, 11.
- Chandwadkar, Pallavi, Hari Sharan Misra, et Celin Acharya. « Uranium Biomineralization Induced by a Metal Tolerant *Serratia* Strain under Acid, Alkaline and Irradiated Conditions ». *Metallomics* 10, n° 8 (2018): 1078-88. <https://doi.org/10.1039/C8MT00061A>.
- Chapon, Virginie, Laurie Piette, Marie-Hélène Vesvres, Frédéric Coppin, Claire Le Marrec, Richard Christen, Nicolas Theodorakopoulos, et al. « Microbial Diversity in Contaminated Soils along the T22 Trench of the Chernobyl Experimental Platform ». *Applied Geochemistry* 27, n° 7 (juillet 2012): 1375-83. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.08.011>.
- Chen, Junlin, Jianping Lu, Siming Chen, Jiawen Wang, et Baogang Zhang. « Synchronous Bio-Reduction of Uranium(VI) and Vanadium(V) in Aquifer: Performance and Mechanisms ». *Chemosphere* 288 (1 février 2022): 132539. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132539>.
- Cho, Kelly, Alma Zholi, Dylan Frabutt, Matthew Flood, Dalton Floyd, et Sonia M. Tiquia.

- « Linking bacterial diversity and geochemistry of uranium-contaminated groundwater ». *Environmental Technology* 33, n° 14 (1 juillet 2012): 1629-40. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.641036>.
- Choudhary, Sangeeta, et Pinaki Sar. « Characterization of a Metal Resistant *Pseudomonas Sp.* Isolated from Uranium Mine for Its Potential in Heavy Metal (Ni²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, and Cd²⁺) Sequestration ». *Bioresource Technology* 100, n° 9 (1 mai 2009): 2482-92. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.015>.
- Choudhary, Sangeeta, et Pinaki Sar. « Identification and Characterization of Uranium Accumulation Potential of a Uranium Mine Isolated *Pseudomonas* Strain ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, n° 8 (août 2011): 1795-1801. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0637-7>.
- Choudhary, Sangeeta, et Pinaki Sar. « Uranium Biomineralization by a Metal Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Strain Isolated from Contaminated Mine Waste ». *Journal of Hazardous Materials* 186, n° 1 (février 2011): 336-43. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.004>.
- Choudhury, R, et S Srivastava. « Zinc Resistance Mechanisms in Bacteria ». *CURRENT SCIENCE* 81, n° 7 (2001).
- Chun, Seong-Jun, Young-Joong Kim, Yingshun Cui, et Kyong-Hee Nam. « Ecological Network Analysis Reveals Distinctive Microbial Modules Associated with Heavy Metal Contamination of Abandoned Mine Soils in Korea ». *Environmental Pollution* 289 (15 novembre 2021): 117851. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117851>.
- Cimermanova, Michaela, Peter Pristas, et Maria Píknova. « Biodiversity of *Actinomycetes* from Heavy Metal Contaminated Technosols ». *Microorganisms* 9, n° 8 (août 2021): 1635. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081635>.
- Coetzee, Johan J., Neetu Bansal, et Evans M. N. Chirwa. « Chromium in Environment, Its Toxic Effect from Chromite-Mining and Ferrochrome Industries, and Its Possible Bioremediation ». *Exposure and Health* 12, n° 1 (mars 2020): 51-62. <https://doi.org/10.1007/s12403-018-0284-z>.
- Cole, Jessica K., Joseph P. Peacock, Jeremy A. Dodsworth, Amanda J. Williams, Daniel B. Thompson, Hailiang Dong, Geng Wu, et Brian P. Hedlund. « Sediment Microbial Communities in Great Boiling Spring Are Controlled by Temperature and Distinct from Water Communities ». *The ISME Journal* 7, n° 4 (avril 2013): 718-29. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.157>.
- Cornu, Sophie, Philippe Négrel, et Michel Brach. « Impact of Carbo-Gaseous Saline Waters Registered by Soils ». *CATENA* 45, n° 3 (septembre 2001): 209-28. [https://doi.org/10.1016/S0341-8162\(01\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S0341-8162(01)00147-3).
- Cumberland, Susan A., Grant Douglas, Kliti Grice, et John W. Moreau. « Uranium Mobility in Organic Matter-Rich Sediments: A Review of Geological and Geochemical Processes ». *Earth-Science Reviews* 159 (août 2016): 160-85. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.05.010>.
- Dang, Duc Huy, Wei Wang, Philip Pelletier, Alexandre J. Poulain, et R. Douglas Evans. « Uranium Dispersion from U Tailings and Mechanisms Leading to U Accumulation in Sediments: Insights from Biogeochemical and Isotopic Approaches ». *Science of The Total Environment* 610-611 (janvier 2018): 880-91. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.156>.
- De Vos, W., T. Tarvainen, R. Salminen, S. Reeder, B. De Vivo, A. Demetriades, S. Pirc, et al. « Geochemical Atlas of Europe : Part 2 : Interpretation of geochemical maps, additional tables, figures, maps, and related publications », 6 novembre 2006. <https://www.bib.irb.hr/268663?lang=EN&print=true&rad=268663&table=knjiga>.
- Dedysh, Svetlana N., et Pelin YR 2018 Yilmaz. « Refining the taxonomic structure of the

- phylum *Acidobacteria* ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, n° 12 (s. d.): 3796-3806. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003062>.
- Dhal, Paltu Kumar, et Pinaki Sar. « Microbial communities in uranium mine tailings and mine water sediment from Jaduguda U mine, India: A culture independent analysis ». *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 49, n° 6 (12 mai 2014): 694-709. <https://doi.org/10.1080/10934529.2014.865458>.
- Dhal, Paltu Kumar. « Bacterial Communities of Uranium-Contaminated Tailing Ponds and Their Interactions with Different Heavy Metals ». In *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects*, édité par Tapan Kumar Adhya, Banwari Lal, Balaram Mohapatra, Dhiraj Paul, et Subhasis Das, 3:109-28. Microorganisms for Sustainability. Singapore: Springer Singapore, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6178-3_6.
- Dhal, Paltu Kumar, Ekramul Islam, Sufia K. Kazy, et Pinaki Sar. « Culture-Independent Molecular Analysis of Bacterial Diversity in Uranium-Ore/-Mine Waste-Contaminated and Non-Contaminated Sites from Uranium Mines ». *3 Biotech* 1, n° 4 (1 décembre 2011): 261-72. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0034-4>.
- Dick, W. A., et M. A. Tabatabai. « Determination of Orthophosphate in Aqueous Solutions Containing Labile Organic and Inorganic Phosphorus Compounds ». *Journal of Environmental Quality* 6, n° 1 (janvier 1977): 82-85. <https://doi.org/10.2134/jeq1977.00472425000600010018x>.
- Ding, Lei, Wen-fa Tan, Shui-bo Xie, Kathryn Mumford, Jun-wen Lv, Hong-qiang Wang, Qi Fang, Xiao-wen Zhang, Xiao-yan Wu, et Mi Li. « Uranium Adsorption and Subsequent Re-Oxidation under Aerobic Conditions by *Leifsonia* Sp. - Coated Biochar as Green Trapping Agent ». *Environmental Pollution* 242 (1 novembre 2018): 778-87. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.050>.
- Djokic, Tara, Martin J. Van Kranendonk, Kathleen A. Campbell, Malcolm R. Walter, et Colin R. Ward. « Earliest Signs of Life on Land Preserved in ca. 3.5 Ga Hot Spring Deposits ». *Nature Communications* 8, n° 1 (9 mai 2017): 15263. <https://doi.org/10.1038/ncomms15263>.
- Dodd, Matthew S., Dominic Papineau, Tor Grenne, John F. Slack, Martin Rittner, Franco Pirajno, Jonathan O'Neil, et Crispin T. S. Little. « Evidence for Early Life in Earth's Oldest Hydrothermal Vent Precipitates ». *Nature* 543, n° 7643 (mars 2017): 60-64. <https://doi.org/10.1038/nature21377>.
- Dong, Wenming, Tetsu K. Tokunaga, James A. Davis, et Jiamin Wan. « Uranium(VI) Adsorption and Surface Complexation Modeling onto Background Sediments from the F-Area Savannah River Site ». *Environmental Science & Technology* 46, n° 3 (7 février 2012): 1565-71. <https://doi.org/10.1021/es2036256>.
- Doose, Caroline, Soizic Morin, Laura Malbezin, Jacky Vedrenne, et Claude Fortin. « Effects of Thorium on Bacterial, Microalgal and Micrometazoan Community Structures in a Periphytic Biofilm ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 218 (15 juillet 2021): 112276. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112276>.
- El Baz, Soraia, Mohamed Baz, Mustapha Barakate, Lahcen Hassani, Abdelhay El Gharmali, et Boujamâa Imzilin. « Resistance to and Accumulation of Heavy Metals by *Actinobacteria* Isolated from Abandoned Mining Areas ». *The Scientific World Journal* 2015 (11 février 2015): e761834. <https://doi.org/10.1155/2015/761834>.
- Elias, D. A., L. R. Krumholz, D. Wong, P. E. Long, et J. M. Suflita. « Characterization of Microbial Activities and U Reduction in a Shallow Aquifer Contaminated by Uranium Mill Tailings ». *Microbial Ecology* 46, n° 1 (1 juillet 2003): 83-91. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-1060-x>.
- Ellis, Richard J., Philip Morgan, Andrew J. Weightman, et John C. Fry. « Cultivation-

- Dependent and -Independent Approaches for Determining Bacterial Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil ». *Applied and Environmental Microbiology* 69, n° 6 (juin 2003): 3223-30. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3223-3230.2003>.
- Escudié, Frédéric, Lucas Auer, Maria Bernard, Mahendra Mariadassou, Laurent Cauquil, Katia Vidal, Sarah Maman, Guillermina Hernandez-Raquet, Sylvie Combes, et Géraldine Pascal. « FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution ». *Bioinformatics* 34, n° 8 (15 avril 2018): 1287-94. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>.
- Falentin, Hélène, Lucas Auer, Mahendra Mariadassou, Géraldine Pascal, Olivier Rué, Eric Dugat-Bony, Céline Delbes, et al. « Guide pratique à destination des biologistes, bioinformaticiens et statisticiens qui souhaitent s'initier aux analyses métabarcoding ». *Cahiers des Techniques de l'INRA* 2019, n° 97 (2019): 1.
- Falkowski, P. G., T. Fenchel, et E. F. Delong. « The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles ». *Science* 320, n° 5879 (23 mai 2008): 1034-39. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>.
- Farrell, Eric M, et Gladys Alexandre. « Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates ». *BMC Research Notes* 5 (24 mai 2012): 257. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-257>.
- Fashola, Muibat, Veronica Ngole-Jeme, et Olubukola Babalola. « Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13, n° 11 (26 octobre 2016): 1047. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111047>.
- Felsenstein, Joseph. « CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP ». *Evolution* 39, n° 4 (1 juillet 1985): 783-91. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Fields, Matthew W., Tingfen Yan, Sung-Keun Rhee, Susan L. Carroll, Phil M. Jardine, David B. Watson, Craig S. Criddle, et Jizhong Zhou. « Impacts on Microbial Communities and Cultivable Isolates from Groundwater Contaminated with High Levels of Nitric Acid–Uranium Waste ». *FEMS Microbiology Ecology* 53, n° 3 (août 2005): 417-28. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.01.010>.
- Fonollosa, E., A. Peñalver, F. Borrull, et C. Aguilar. « Radon in Spring Waters in the South of Catalonia ». *Journal of Environmental Radioactivity* 151 (janvier 2016): 275-81. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2015.10.019>.
- Fouillac, C. « Chemical Geothermometry in CO₂-Rich Thermal Waters. Example of the French Massif Central ». *Geothermics* 12, n° 2-3 (janvier 1983): 149-60. [https://doi.org/10.1016/0375-6505\(83\)90025-1](https://doi.org/10.1016/0375-6505(83)90025-1).
- Francis, Arokiasamy J., J. B. Gillow, Cleveland J. Dodge, R. Harris, T. J. Beveridge, et H. W. Papenguth. « Uranium Association with Halophilic and Non-Halophilic Bacteria and Archaea ». *Radiochimica Acta* 92, n° 8 (1 août 2004): 481-88. <https://doi.org/10.1524/ract.92.8.481.39281>.
- Fredrickson, James K., John M. Zachara, David W. Kennedy, Chongxuan Liu, Martine C. Duff, Douglas B. Hunter, et Alice Dohnalkova. « Influence of Mn Oxides on the Reduction of Uranium(VI) by the Metal-Reducing Bacterium *Shewanella Putrefaciens* ». *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, n° 18 (septembre 2002): 3247-62. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)00928-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)00928-6).
- Fullerton, Heather, et Craig L. Moyer. « Comparative Single-Cell Genomics of *Chloroflexi* from the Okinawa Trough Deep-Subsurface Biosphere ». *Applied and Environmental Microbiology* 82, n° 10 (15 mai 2016): 3000-3008. <https://doi.org/10.1128/AEM.00624-16>.
- Gadd, Geoffrey M., et Marina Fomina. « Uranium and Fungi ». *Geomicrobiology Journal* 28,

- n° 5-6 (juin 2011): 471-82. <https://doi.org/10.1080/01490451.2010.508019>.
- Gadd, Geoffrey Michael. « Biosorption: Critical Review of Scientific Rationale, Environmental Importance and Significance for Pollution Treatment ». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84, n° 1 (janvier 2009): 13-28. <https://doi.org/10.1002/jctb.1999>.
- Gallois, Nicolas. « Proteogenomic Insights into Uranium Tolerance of a Chernobyl's *Microbacterium* Bacterial Isolate ». *Journal of Proteomics*, 2018, 10.
- Gao, Ning, Zhihui Huang, Haiqiang Liu, Jing Hou, et Xinhui Liu. « Advances on the Toxicity of Uranium to Different Organisms ». *Chemosphere* 237 (1 décembre 2019): 124548. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124548>.
- Gaur, Ruchi, Tripti Grover, Rita Sharma, Sanjay Kapoor, et Sunil K. Khare. « Purification and Characterization of a Solvent Stable Aminopeptidase from *Pseudomonas Aeruginosa*: Cloning and Analysis of Aminopeptidase Gene Conferring Solvent Stability ». *Process Biochemistry* 45, n° 5 (mai 2010): 757-64. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.01.017>.
- Gerber, U., I. Zirnstein, E. Krawczyk-Bärsch, H. Lünsdorf, T. Arnold, et M. L. Merroun. « Combined Use of Flow Cytometry and Microscopy to Study the Interactions between the Gram-Negative Betaproteobacterium *Acidovorax Facilis* and Uranium(VI) ». *Journal of Hazardous Materials* 317 (5 novembre 2016): 127-34. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.062>.
- Ghosh, Devanita, Punyasloke Bhadury, et Joyanto Routh. « Coping with Arsenic Stress: Adaptations of Arsenite-Oxidizing Bacterial Membrane Lipids to Increasing Arsenic Levels ». *MicrobiologyOpen* 7, n° 5 (2018): e00594. <https://doi.org/10.1002/mbo3.594>.
- Gihring, Thomas M., Gengxin Zhang, Craig C. Brandt, Scott C. Brooks, James H. Campbell, Susan Carroll, Craig S. Criddle, et al. « A Limited Microbial Consortium Is Responsible for Extended Bioreduction of Uranium in a Contaminated Aquifer ». *Applied and Environmental Microbiology* 77, n° 17 (septembre 2011): 5955-65. <https://doi.org/10.1128/AEM.00220-11>.
- Girault, Frédéric, Frédéric Perrier, et Tadeusz A. Przylibski. « Radon-222 and Radium-226 Occurrence in Water: A Review ». *Geological Society, London, Special Publications* 451, n° 1 (janvier 2018): 131-54. <https://doi.org/10.1144/SP451.3>.
- Goswami, Lalit, N. Arul Manikandan, Kannan Pakshirajan, et G. Pugazhenthii. « Simultaneous Heavy Metal Removal and Anthracene Biodegradation by the Oleaginous Bacteria *Rhodococcus Opacus* ». *3 Biotech* 7, n° 1 (24 avril 2017): 37. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0597-1>.
- Grady, Elliot Nicholas, Jacqueline MacDonald, Linda Liu, Alex Richman, et Ze-Chun Yuan. « Current Knowledge and Perspectives of *Paenibacillus*: A Review ». *Microbial Cell Factories* 15, n° 1 (1 décembre 2016): 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>.
- Grenthe, Ingmar, Janusz Drożdżyński, Takeo Fujino, Edgar Buck, Thomas Albrecht-Schmitt, et Stephen Wolf. « The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements, Vol. 1 », 253-698, 2006. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0211-0_5.
- Grybos, Malgorzata, Mélanie Davranche, Gérard Gruau, et Patrice Petitjean. « Is Trace Metal Release in Wetland Soils Controlled by Organic Matter Mobility or Fe-Oxyhydroxides Reduction? » *Journal of Colloid and Interface Science* 314, n° 2 (15 octobre 2007): 490-501. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.04.062>.
- Guo, Xing-pan, Yi Yang, Zuo-shun Niu, Da-Pei Lu, Chun-hong Zhu, Jing-nan Feng, Jia-yuan Wu, et al. « Characteristics of Microbial Community Indicate Anthropogenic Impact on the Sediments along the Yangtze Estuary and Its Coastal Area, China ». *Science of The Total Environment* 648 (15 janvier 2019): 306-14.

- <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.162>.
- Gupta, Dr. G., Dr. Seweta Srivastava, Sunil Khare, et Veeru Prakash. « Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment ». *International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology* 7 (24 juin 2014): 371-80. <https://doi.org/10.5958/2230-732X.2014.00258.7>.
- Haas, Johnson R, Thomas J Dichristina, et Roy Wade. « Thermodynamics of U(VI) Sorption onto *Shewanella putrefaciens* ». *Chemical Geology, Experimental and Theoretical Geomicrobiology*, 180, n° 1 (1 octobre 2001): 33-54. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(01\)00304-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(01)00304-7).
- Haki, G. « Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review ». *Bioresource Technology* 89, n° 1 (août 2003): 17-34. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6).
- Hanbo, Zhang, Duan Changqun, Shao Qiyong, Ren Weimin, Sha Tao, Cheng Lizhong, Zhao Zhiwei, et Hu Bin. « Genetic and physiological diversity of phylogenetically and geographically distinct groups of *Arthrobacter* isolated from lead–zinc mine tailings ». *FEMS Microbiology Ecology* 49, n° 2 (1 août 2004): 333-41. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.009>.
- Hesse, Elze, Siobhán O'Brien, Nicolas Tromas, Florian Bayer, Adela M. Luján, Eleanor M. van Veen, Dave J. Hodgson, et Angus Buckling. « Ecological Selection of Siderophore-Producing Microbial Taxa in Response to Heavy Metal Contamination ». *Ecology Letters* 21, n° 1 (2018): 117-27. <https://doi.org/10.1111/ele.12878>.
- Heulin, Thierry, Mohamed Barakat, Richard Christen, Maurice Lesourd, Laurent Sutra, Gilles De Luca, et Wafa Achouak. « *Ramlibacter Tataouinensis* Gen. Nov., Sp. Nov., and *Ramlibacter Henchirensis* Sp. Nov., Cyst-Producing Bacteria Isolated from Subdesert Soil in Tunisia ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, n° 2 (1 mars 2003): 589-94. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02482-0>.
- Hlihor, Raluca Maria, Hugo Figueiredo, Teresa Tavares, et Maria Gavrilescu. « Biosorption Potential of Dead and Living *Arthrobacter Viscosus* Biomass in the Removal of Cr(VI): Batch and Column Studies ». *Process Safety and Environmental Protection* 108 (mai 2017): 44-56. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.06.016>.
- Horváth, Á., L.O. Bohus, F. Urbani, G. Marx, A. Piróth, et E.D. Greaves. « Radon Concentrations in Hot Spring Waters in Northern Venezuela ». *Journal of Environmental Radioactivity* 47, n° 2 (janvier 2000): 127-33. [https://doi.org/10.1016/S0265-931X\(99\)00032-6](https://doi.org/10.1016/S0265-931X(99)00032-6).
- Hothorn, Torsten, Frank Bretz, et Peter Westfall. « Simultaneous Inference in General Parametric Models ». *Biometrical Journal* 50, n° 3 (2008): 346-63. <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>.
- Hoyos-Hernandez, Carolina, Christelle Courbert, Caroline Simonucci, Sebastien David, Timothy M Vogel, et Catherine Larose. « Community structure and functional genes in radionuclide contaminated soils in Chernobyl and Fukushima ». *FEMS Microbiology Letters* 366, n° 21 (1 novembre 2019): fnz180. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz180>.
- Hu, Michael Z.-C., John M. Norman, Brendlyn D. Faison, et Mark E. Reeves. « Biosorption of Uranium by *Pseudomonas Aeruginosa* Strain CSU: Characterization and Comparison Studies ». *Biotechnology and Bioengineering* 51, n° 2 (1996): 237-47. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960720\)51:2<237::AID-BIT14>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960720)51:2<237::AID-BIT14>3.0.CO;2-J).
- Huang, Wenbo, Xiaoqin Nie, Faqin Dong, Congcong Ding, Rong Huang, Yilin Qin, Mingxue Liu, et Shiyong Sun. « Kinetics and PH-Dependent Uranium Bioprecipitation by *Shewanella Putrefaciens* under Aerobic Conditions ». *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 312, n° 3 (juin 2017): 531-41. <https://doi.org/10.1007/s10967-017->

- 5261-7.
- Huber, Katharina J., et Jörg YR 2018 Overmann. « *Vicinamibacteraceae* fam. nov., the first described family within the subdivision 6 *Acidobacteria* ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, n° 7 (s. d.): 2331-34. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002841>.
- Hug, Laura A., Cindy J. Castelle, Kelly C. Wrighton, Brian C. Thomas, Itai Sharon, Kyle R. Frischkorn, Kenneth H. Williams, Susannah G. Tringe, et Jillian F. Banfield. « Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the *Chloroflexi* phylum and indicate roles in sediment carbon cycling ». *Microbiome* 1, n° 1 (5 août 2013): 22. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-22>.
- Husson, Angélique, Martine Leermakers, Michael Descostes, et Vincent Lagneau. « Environmental Geochemistry and Bioaccumulation/Bioavailability of Uranium in a Post-Mining Context – The Bois-Noirs Limouzat Mine (France) ». *Chemosphere* 236 (décembre 2019): 124341. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124341>.
- Ielsch, Geraldine, Michel Cuney, François Buscaïl, Frédéric Rossi, A. Leon, et Edward Cushing. « Estimation and mapping of uranium content of geological units in France ». *Journal of Environmental Radioactivity* 166 (1 juin 2016). <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.05.022>.
- IRSN. « Uranium naturel et environnement », 2010.
- Isaure, Marie-Pierre, Marine Albertelli, Isabelle Kieffer, Rémi Tucoulou, Melina Petrel, Etienne Gontier, Emmanuel Tessier, Mathilde Monperrus, et Marisol Goñi-Urriza. « Relationship Between Hg Speciation and Hg Methylation/Demethylation Processes in the Sulfate-Reducing Bacterium *Pseudodesulfovibrio Hydrargyri*: Evidences From HERFD-XANES and Nano-XRF ». *Frontiers in Microbiology* 11 (14 octobre 2020): 584715. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.584715>.
- Islam, Ekramul, Paltu K. Dhal, Sufia K. Kazy, et Pinaki Sar. « Molecular Analysis of Bacterial Communities in Uranium Ores and Surrounding Soils from Banduhurang Open Cast Uranium Mine, India: A Comparative Study ». *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 46, n° 3 (31 janvier 2011): 271-80. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.535433>.
- Islam, Ekramul, et Pinaki Sar. « Culture-Dependent and -Independent Molecular Analysis of the Bacterial Community within Uranium Ore ». *Journal of Basic Microbiology* 51, n° 4 (2011): 372-84. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000327>.
- Islam, Ekramul, et Pinaki Sar. « Diversity, Metal Resistance and Uranium Sequestration Abilities of Bacteria from Uranium Ore Deposit in Deep Earth Stratum ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 127 (mai 2016): 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.001>.
- Ivanitsa, V. O., T. V. Vasilyeva, E. A. Buchitiyarov, E. B. Lindström, et S. McEldowney. « Interactions between Marine Bacteria and Heavy Metals ». In *Process Metallurgy*, édité par R. Amils et A. Ballester, 9:317-25. Biohydrometallurgy and the Environment Toward the Mining of the 21 Century - Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium. Elsevier, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1572-4409\(99\)80121-7](https://doi.org/10.1016/S1572-4409(99)80121-7).
- Jaafar, Raghad Shubbar. « The potential role of *Sphingomonas Paucimobilis* in bioremediation of soils contaminated with hydrocarbon and heavy metal: Bioremediation Using *Sphingomonas Paucimobilis* ». *Malaysian Journal of Science*, 31 décembre 2019, 48-58. <https://doi.org/10.22452/mjs.vol38no3.5>.
- Jabbar, Tania, et Gabriele Wallner. « Biotransformation of Radionuclides: Trends and Challenges ». In *Radionuclides in the Environment: Influence of Chemical Speciation and Plant Uptake on Radionuclide Migration*, édité par Clemens Walther et

- Dharmendra K. Gupta, 169-84. Cham: Springer International Publishing, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22171-7_10.
- Jackson, Colin R., et Andrew Q. Weeks. « Influence of Particle Size on Bacterial Community Structure in Aquatic Sediments as Revealed by 16S rRNA Gene Sequence Analysis ». *Applied and Environmental Microbiology* 74, n° 16 (15 août 2008): 5237-40. <https://doi.org/10.1128/AEM.00923-08>.
- Jankowski, Ulrike, Mohamed L. Merroun, Sonja Selenska-Pobell, et Karim Fahmy. « S-Layer Protein from *Lysinibacillus Sphaericus* JG-A12 as Matrix for Au^{III} Sorption and Au-Nanoparticle Formation ». *Spectroscopy* 24, n° 1-2 (2010): 177-81. <https://doi.org/10.1155/2010/319249>.
- Janssen, Peter H. « Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes ». *Applied and Environmental Microbiology* 72, n° 3 (mars 2006): 1719-28. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>.
- Jaswal, Rajneesh, Ashish Pathak, Bobby Edwards III, Robert Lewis III, John C. Seaman, Paul Stothard, Kirill Krivushin, Jochen Blom, Oliver Rupp, et Ashvini Chauhan. « Metagenomics-Guided Survey, Isolation, and Characterization of Uranium Resistant Microbiota from the Savannah River Site, USA ». *Genes* 10, n° 5 (mai 2019): 325. <https://doi.org/10.3390/genes10050325>.
- Johnson, D.A. & Florence, T.M., 1971. Spectrophotometric determination of uranium(VI) with 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol. *Analytica Chimica Acta*, 53 (1), 73–79.
- Jonathan, Piard, et Jérôme Randon. « L'absorbance : comment rendre sa compréhension plus lumineuse aux yeux des apprenants », 1 octobre 2021.
- Jroundi, Fadwa, Francisca Martinez-Ruiz, Mohamed L. Merroun, et María Teresa Gonzalez-Muñoz. « Exploring Bacterial Community Composition in Mediterranean Deep-Sea Sediments and Their Role in Heavy Metal Accumulation ». *Science of The Total Environment* 712 (avril 2020): 135660. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135660>.
- Kalaycı Kara, Ayşe, Özden Fakioğlu, Recep Kotan, Muhammed Atamanalp, et Gonca Alak. « The Investigation of Bioremediation Potential of *Bacillus Subtilis* and *B. Thuringiensis* Isolates under Controlled Conditions in Freshwater ». *Archives of Microbiology* 203, n° 5 (1 juillet 2021): 2075-85. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02187-9>.
- Kalin, Margarete, W.N. Wheeler, et G. Meinrath. « The Removal of Uranium from Mining Waste Water Using Algal/Microbial Biomass ». *Journal of Environmental Radioactivity* 78, n° 2 (2005): 151-77. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.05.002>.
- Karan, Ram. « Gene Identification and Molecular Characterization of Solvent Stable Protease from A Moderately Haloalkaliphilic Bacterium, *Geomicrobium* Sp. EMB2 ». *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, n° 2 (février 2011): 129-35. <https://doi.org/10.4014/jmb.1007.07064>.
- Kazy, Sufia, Stanislaus D'Souza, et Pinaki Sar. « Uranium and Thorium Sequestration by a *Pseudomonas* sp.: Mechanism and Chemical Characterization ». *Journal of hazardous materials* 163 (1 juillet 2008): 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.076>.
- Kelly, S. D., K. M Kemner, J. B Fein, D. A Fowle, M. I Boyanov, B. A Bunker, et N Yee. « X-Ray Absorption Fine Structure Determination of pH-Dependent U-Bacterial Cell Wall Interactions ». *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, n° 22 (15 novembre 2002): 3855-71. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)00947-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)00947-X).
- Khare, Devanshi, Rakshak Kumar, et Celin Acharya. « Genomic and Functional Insights into the Adaptation and Survival of *Chryseobacterium* sp. Strain PMSZPI in Uranium Enriched Environment ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 191 (mars 2020):

110217. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110217>.
- Khemiri, Arbia, Marie Carrière, Nicolas Bremond, Mohamed Amine Ben Mlouka, Laurent Coquet, Isabelle Llorens, Virginie Chapon, Thierry Jouenne, Pascal Cosette, et Catherine Berthomieu. « *Escherichia Coli* Response to Uranyl Exposure at Low pH and Associated Protein Regulations ». *PLOS ONE* 9, n° 2 (26 février 2014): e89863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089863>.
- Kielak, Anna M., Cristine C. Barreto, George A. Kowalchuk, Johannes A. van Veen, et Eiko E. Kuramae. « The Ecology of *Acidobacteria*: Moving beyond Genes and Genomes ». *Frontiers in Microbiology* 7 (2016). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00744>.
- Kitto, Michael, Pravin Parekh, Miguel Torres, et Dominik Schneider. « Radionuclide and chemical concentrations in mineral waters at Saratoga Springs, New York ». *Journal of environmental radioactivity* 80 (1 février 2005): 327-39. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.10.006>.
- Knopp, Roger, Petra J. Panak, Lewis A. Wray, Neil S. Renninger, Jay D. Keasling, et Heino Nitsche. « Laser Spectroscopic Studies of Interactions of UVI with Bacterial Phosphate Species ». *Chemistry – A European Journal* 9, n° 12 (2003): 2812-18. <https://doi.org/10.1002/chem.200304711>.
- Knox, A. S., D. I. Kaplan, et T. G. Hinton. « Elevated Uptake of Th and U by Netted Chain Fern (*Woodwardia Areolata*) ». *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 277, n° 1 (1 juillet 2008): 169-73. <https://doi.org/10.1007/s10967-008-0726-3>.
- Kociak, M. « Introduction à la microscopie électronique ». *École thématique de la Société Française de la Neutronique* 12 (2007): 61-74. <https://doi.org/10.1051/sfn:2007006>.
- Kolhe, Nilesh, Smita Zinjarde, et Celin Acharya. « Responses Exhibited by Various Microbial Groups Relevant to Uranium Exposure ». *Biotechnology Advances* 36, n° 7 (novembre 2018): 1828-46. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.07.002>.
- Krawczyk-Bärsch, E., U. Gerber, K. Müller, H. Moll, A. Rossberg, R. Steudtner, et M.L. Merroun. « Multidisciplinary Characterization of U(VI) Sequestration by *Acidovorax Facilis* for Bioremediation Purposes ». *Journal of Hazardous Materials* 347 (avril 2018): 233-41. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.030>.
- Kulichevskaya, Irina S., Natalia E. Suzina, W. Irene C. Rijpstra, Jaap S. Sinninghe Damsté, et Svetlana N.YR 2014 Dedysh. « *Paludibaculum fermentans* gen. nov., sp. nov., a facultative anaerobe capable of dissimilatory iron reduction from subdivision 3 of the *Acidobacteria* ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, n° Pt_8 (s. d.): 2857-64. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066175-0>.
- Kulkarni, Sayali, Chitra Seetharam Misra, Alka Gupta, Anand Ballal, et Shree Kumar Apte. « Interaction of Uranium with Bacterial Cell Surfaces: Inferences from Phosphatase-Mediated Uranium Precipitation ». Édité par S.-J. Liu. *Applied and Environmental Microbiology* 82, n° 16 (15 août 2016): 4965-74. <https://doi.org/10.1128/AEM.00728-16>.
- Kumar, Rakshak, Celin Acharya, et Santa Ram Joshi. « Isolation and Analyses of Uranium Tolerant *Serratia Marcescens* Strains and Their Utilization for Aerobic Uranium U(VI) Bioadsorption ». *The Journal of Microbiology* 49, n° 4 (août 2011): 568-74. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0366-0>.
- Kumar, Rakshak, Macmillan Nongkhaw, Celin Acharya, et Santa Ram Joshi. « Uranium (U)-Tolerant Bacterial Diversity from U Ore Deposit of Domiasiat in North-East India and Its Prospective Utilisation in Bioremediation ». *Microbes and Environments* 28, n° 1 (2013): 33-41. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12074>.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, et Koichiro Tamura. « MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms ». Édité par

- Fabia Ursula Battistuzzi. *Molecular Biology and Evolution* 35, n° 6 (1 juin 2018): 1547-49. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Kushwaha, Anamika, Nidhi Hans, Sanjay Kumar, et Radha Rani. « A Critical Review on Speciation, Mobilization and Toxicity of Lead in Soil-Microbe-Plant System and Bioremediation Strategies ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147 (1 janvier 2018): 1035-45. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.049>.
- Ladomersky, Erik, et Michael J Petris. « Copper tolerance and virulence in bacteria ». *Metallomics* 7, n° 6 (1 juin 2015): 957-64. <https://doi.org/10.1039/c4mt00327f>.
- Lamichhane, Jay Ram, Ebrahim Osdaghi, Franklin Behlau, Jürgen Köhl, Jeffrey B. Jones, et Jean-Noël Aubertot. « Thirteen Decades of Antimicrobial Copper Compounds Applied in Agriculture. A Review ». *Agronomy for Sustainable Development* 38, n° 3 (24 mai 2018): 28. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>.
- Lauber, Christian L., Michael S. Strickland, Mark A. Bradford, et Noah Fierer. « The Influence of Soil Properties on the Structure of Bacterial and Fungal Communities across Land-Use Types ». *Soil Biology and Biochemistry*, Special Section: Enzymes in the Environment, 40, n° 9 (1 septembre 2008): 2407-15. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.021>.
- Lê Cao, Kim-Anh, Mary-Ellen Costello, Vanessa Anne Lakis, François Bartolo, Xin-Yi Chua, Rémi Brazeilles, et Pascale Rondeau. « MixMC: A Multivariate Statistical Framework to Gain Insight into Microbial Communities ». Édité par Gabriel Moreno-Hagelsieb. *PLOS ONE* 11, n° 8 (11 août 2016): e0160169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160169>.
- Lê, Sébastien, Julie Josse, et François Husson. « FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis ». *Journal of Statistical Software* 25, n° 1 (2008). <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>.
- Li, Bing, Wei-Min Wu, David B. Watson, Erick Cardenas, Yuanqing Chao, D. H. Phillips, Tonia Mehlhorn, et al. « Bacterial Community Shift and Coexisting/Coexcluding Patterns Revealed by Network Analysis in a Uranium-Contaminated Site after Bioreduction Followed by Reoxidation ». *Applied and Environmental Microbiology* 84, n° 9 (s. d.): e02885-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02885-17>.
- Li, Changchao, Quan Quan, Yandong Gan, Junyu Dong, Jiaohui Fang, Lifei Wang, et Jian Liu. « Effects of Heavy Metals on Microbial Communities in Sediments and Establishment of Bioindicators Based on Microbial Taxa and Function for Environmental Monitoring and Management ». *Science of The Total Environment* 749 (20 décembre 2020): 141555. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141555>.
- Li, Dianxin, Yiqing Yang, Peng Zhang, Jiangang Liu, Tao Li, et Junwei Yang. « U(VI) adsorption in water by sodium alginate modified *Bacillus megaterium* ». *Royal Society Open Science* 8, n° 2 (s. d.): 202098. <https://doi.org/10.1098/rsos.202098>.
- Li, Dien, John C. Seaman, Hyun-Shik Chang, Peter R. Jaffe, Paul Koster van Groos, De-Tong Jiang, Ning Chen, et al. « Retention and Chemical Speciation of Uranium in an Oxidized Wetland Sediment from the Savannah River Site ». *Journal of Environmental Radioactivity* 131 (mai 2014): 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.10.017>.
- Li, Fei, Yuanlin Huang, Wenjin Hu, Zhe Li, Qiaozhen Wang, Shushi Huang, Fajun Jiang, et XinliYR 2021 Pan. « *Roseomonas coralli* sp. nov., a heavy metal resistant bacterium isolated from coral ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71, n° 2 (s. d.): 004624. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004624>.
- Li, Runwei, Victor Ibeanusi, Jada Hoyle-Gardner, Christy Crandall, Charles Jagoe, John Seaman, Aavudai Anandhi, et Gang Chen. « Bacterial-Facilitated Uranium Transport in the Presence of Phytate at Savannah River Site ». *Chemosphere* 223 (1 mai 2019): 351-57. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.064>.

- Li, Xiangyang, Linshuang Zhang, et Gejiao Wang. « Genomic Evidence Reveals the Extreme Diversity and Wide Distribution of the Arsenic-Related Genes in *Burkholderiales* ». *PLOS ONE* 9, n° 3 (14 mars 2014): e92236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092236>.
- Li, Xiaolong, Congcong Ding, Jiali Liao, Liang Du, Qun Sun, Jijun Yang, Yuanyou Yang, Dong Zhang, Jun Tang, et Ning Liu. « Bioaccumulation Characterization of Uranium by a Novel *Streptomyces Sporoverrucosus Dwc-3* ». *Journal of Environmental Sciences* 41 (mars 2016): 162-71. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.06.007>.
- Li, Xiaolong, Congcong Ding, Jiali Liao, Liang Du, Qun Sun, Jijun Yang, Yuanyou Yang, Dong Zhang, Jun Tang, et Ning Liu. « Microbial Reduction of Uranium (VI) by *Bacillus Sp. Dwc-2*: A Macroscopic and Spectroscopic Study ». *Journal of Environmental Sciences* 53 (1 mars 2017): 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.01.030>.
- Li, Xiaolong, Congcong Ding, Jiali Liao, Tu Lan, Feize Li, Dong Zhang, Jijun Yang, et al. « Biosorption of Uranium on *Bacillus Sp. Dwc-2*: Preliminary Investigation on Mechanism ». *Journal of Environmental Radioactivity* 135 (septembre 2014): 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.03.017>.
- Lin, Tzu-Yu, Chia-Cheng Wei, Chi-Wei Huang, Chun-Han Chang, Fu-Lan Hsu, et Vivian Hsiu-Chuan Liao. « Both Phosphorus Fertilizers and Indigenous Bacteria Enhance Arsenic Release into Groundwater in Arsenic-Contaminated Aquifers ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, n° 11 (23 mars 2016): 2214-22. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00253>.
- Liu, Lei, Jing Liu, Xiaoting Liu, Chengwei Dai, Zexin Zhang, Wencheng Song, et Yinnan Chu. « Kinetic and Equilibrium of U(VI) Biosorption onto the Resistant Bacterium *Bacillus Amyloliquefaciens* ». *Journal of Environmental Radioactivity* 203 (juillet 2019): 117-24. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.03.008>.
- Lloyd, Jonathan R. « Microbial Reduction of Metals and Radionuclides ». *FEMS Microbiology Reviews* 27, n° 2-3 (2003): 411-25. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00044-5).
- López-Fernández, Margarita, Omar Fernández-Sanfrancisco, Alberto Moreno-García, Inés Martín-Sánchez, Iván Sánchez-Castro, et Mohamed Larbi Merroun. « Microbial Communities in Bentonite Formations and Their Interactions with Uranium ». *Applied Geochemistry* 49 (octobre 2014): 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.06.022>.
- Lopez-Fernandez, Margarita, Fadwa Jroundi, Miguel A. Ruiz-Fresneda, et Mohamed L. Merroun. « Microbial Interaction with and Tolerance of Radionuclides: Underlying Mechanisms and Biotechnological Applications ». *Microbial Biotechnology* 14, n° 3 (2021): 810-28. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13718>.
- Lovley, D R, et E J Phillips. « Reduction of Uranium by *Desulfovibrio Desulfuricans* ». *Applied and Environmental Microbiology* 58, n° 3 (mars 1992): 850-56. <https://doi.org/10.1128/aem.58.3.850-856.1992>.
- Lovley, Derek R., Elizabeth J. P. Phillips, Yuri A. Gorby, et Edward R. Landa. « Microbial Reduction of Uranium ». *Nature* 350, n° 6317 (avril 1991): 413-16. <https://doi.org/10.1038/350413a0>.
- Lozano, Lucía C., et Jenny Dussán. « Metal Tolerance and Larvicidal Activity of *Lysinibacillus Sphaericus* ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29, n° 8 (août 2013): 1383-89. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1301-9>.
- Lu, Xiaolu, Yining Zhang, Chaoyang Liu, Mengxiaojun Wu, et Hongmei Wang. « Characterization of the Antimonite- and Arsenite-Oxidizing Bacterium *Bosea Sp. AS-1* and Its Potential Application in Arsenic Removal ». *Journal of Hazardous Materials* 359 (5 octobre 2018): 527-34. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.112>.
- Luo, Yan, Zuo Ming Xie, Yi Fang Zhou, et Yan Xin Wang. « Bacterial Diversity in the High

- Arsenic Groundwater Systems of Jiangnan Plain and Datong Basin by 16S RDNA Clone Library ». *Advanced Materials Research* 726-731 (2013): 35-38. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.726-731.35>.
- Lusa, Merja, et Malin Bomberg. « Microbial Community Composition Correlates with Metal Sorption in an Ombrotrophic Boreal Bog: Implications for Radionuclide Retention ». *Soil Systems* 5, n° 1 (mars 2021): 19. <https://doi.org/10.3390/soilsystems5010019>.
- Lusa, Merja, Jenna Knuutinen, Marcus Lindgren, Juhani Virkanen, et Malin Bomberg. « Microbial Communities in a Former Pilot-Scale Uranium Mine in Eastern Finland – Association with Radium Immobilization ». *Science of The Total Environment* 686 (octobre 2019): 619-40. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.432>.
- Macaskie, Lynne E., Karen M. Bonthron, Ping Yong, et David T. Goddard. « Enzymically Mediated Bioprecipitation of Uranium by a *Citrobacter* Sp.: A Concerted Role for Exocellular Lipopolysaccharide and Associated Phosphatase in Biomineral Formation ». *Microbiology* 146, n° 8 (1 août 2000): 1855-67. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-8-1855>.
- Macaskie, Lynne E., Ruth M. Empson, Anthony K. Cheetham, Clare P. Grey, et A. Jerome Skarnulis. « Uranium Bioaccumulation by a *Citrobacter* sp. as a Result of Enzymically Mediated Growth of Polycrystalline HUO_2PO_4 ». *Science* 257, n° 5071 (7 août 1992): 782-84. <https://doi.org/10.1126/science.1496397>.
- Mahub, Khandaker Rayhan, Kannan Krishnan, Mallavarapu Megharaj, et Ravi Naidu. « Bioremediation Potential of a Highly Mercury Resistant Bacterial Strain *Sphingobium* SA2 Isolated from Contaminated Soil ». *Chemosphere* 144 (1 février 2016): 330-37. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.061>.
- Mahé, Frédéric, Torbjørn Rognes, Christopher Quince, Colomban de Vargas, et Micah Dunthorn. « Swarm: Robust and Fast Clustering Method for Amplicon-Based Studies ». *PeerJ* 2 (25 septembre 2014): e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>.
- Mangeret, Arnaud, Pascale Blanchart, Gilles Alcalde, Xavier Amet, Charlotte Cazala, et Marie-Odile Gallerand. « An Evidence of Chemically and Physically Mediated Migration of ^{238}U and Its Daughter Isotopes in the Vicinity of a Former Uranium Mine ». *Journal of Environmental Radioactivity* 195 (1 décembre 2018): 67-71. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2018.08.018>.
- Mao, Jun, Qiyong Tang, Zhi-Dong Zhang, Wei Wang, Dong Wei, Ying Huang, Zhiheng Liu, Yuhu Shi, et Michael Goodfellow. « *Streptomyces radiopugnans* sp nov., a radiation-resistant actinomycete isolated from radiation-polluted soil in China ». *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57 (1 décembre 2007): 2578-82. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65027-0>.
- Markich, Scott J. « Uranium Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems: An Overview ». *The Scientific World JOURNAL* 2 (2002): 707-29. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.130>.
- Martin, A., Y. Hassan-Loni, A. Fichtner, O. Péron, K. David, P. Chardon, S. Larrue, et al. « An Integrated Approach Combining Soil Profile, Records and Tree Ring Analysis to Identify the Origin of Environmental Contamination in a Former Uranium Mine (Rophin, France) ». *Science of The Total Environment* 747 (décembre 2020): 141295. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141295>.
- Martineau, Christine, Céline Villeneuve, Florian Mauffrey, et Richard Villemur. « *Hyphomicrobium Nitrativorans* Sp. Nov., Isolated from the Biofilm of a Methanol-Fed Denitrification System Treating Seawater at the Montreal Biodome ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, n° Pt 10 (octobre 2013): 3777-81. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.048124-0>.
- Martinez, Robert J., Melanie J. Beazley, Martial Taillefert, Adrian K. Arakaki, Jeffrey

- Skolnick, et Patricia A. Sobecky. « Aerobic Uranium (VI) Bioprecipitation by Metal-Resistant Bacteria Isolated from Radionuclide- and Metal-Contaminated Subsurface Soils ». *Environmental Microbiology* 9, n° 12 (2007): 3122-33. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01422.x>.
- Martinez, Robert J., Yanling Wang, Melanie A. Raimondo, Jonna M. Coombs, Tamar Barkay, et Patricia A. Sobecky. « Horizontal Gene Transfer of PIB-Type ATPases among Bacteria Isolated from Radionuclide- and Metal-Contaminated Subsurface Soils ». *Applied and Environmental Microbiology* 72, n° 5 (1 mai 2006): 3111-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3111-3118.2006>.
- Martínez-Rodríguez, Pablo, Iván Sánchez-Castro, Jesús Ojeda, María Abad, M. Descostes, et Merroun Mohamed. « Effect of different phosphate sources on uranium biomineralization by the *Microbacterium sp. Be9* strain: A multidisciplinary approach study ». *Frontiers in Microbiology* 13 (9 janvier 2023): 1092184. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1092184>.
- Masoumi, Fatemeh, Elnaz Khadivinia, Leila Alidoust, Zahra Mansourinejad, Shahab Shahryari, Mahdiah Safaei, Amir Mousavi, et al. « Nickel and Lead Biosorption by *Curtobacterium Sp. FM01*, an Indigenous Bacterium Isolated from Farmland Soils of Northeast Iran ». *Journal of Environmental Chemical Engineering* 4, n° 1 (mars 2016): 950-57. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.12.025>.
- Mathew, Blessy Baby, Vinai George Biju, et Krishnamurthy Nideghatta Beeregowda. « Accumulation of Lead (Pb II) Metal Ions by *Bacillus Toyonensis SCE1* Species, Innate to Industrial-Area Ground Water and Nanoparticle Synthesis ». *Applied Nanoscience* 9, n° 1 (février 2019): 49-66. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0892-8>.
- McMurdie, Paul J., et Susan Holmes. « Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data ». *PLOS ONE* 8, n° 4 (22 avril 2013): e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- Meng, Fande, Guodong Yuan, Steven L. Larson, John H. Ballard, Charles A. Waggoner, Zikri Arslan, et Fengxiang X. Han. « Removing Uranium (VI) from Aqueous Solution with Insoluble Humic Acid Derived from Leonardite ». *Journal of Environmental Radioactivity* 180 (décembre 2017): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.09.019>.
- Merroun, Mohamed L., Marta Nedelkova, Jesus J. Ojeda, Thomas Reitz, Margarita López Fernández, José M. Arias, María Romero-González, et Sonja Selenska-Pobell. « Bioprecipitation of uranium by two bacterial isolates recovered from extreme environments as estimated by potentiometric titration, TEM and X-ray absorption spectroscopic analyses ». *Journal of Hazardous Materials* 197 (décembre 2011): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.049>.
- Merroun, Mohamed L., Johannes Raff, André Rossberg, Christoph Hennig, Tobias Reich, et Sonja Selenska-Pobell. « Complexation of Uranium by Cells and S-Layer Sheets of *Bacillus Sphaericus JG-A12* ». *Applied and Environmental Microbiology* 71, n° 9 (septembre 2005): 5532-43. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5532-5543.2005>.
- Merroun, Mohamed L., et Sonja Selenska-Pobell. « Bacterial Interactions with Uranium: An Environmental Perspective ». *Journal of Contaminant Hydrology* 102, n° 3-4 (décembre 2008): 285-95. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2008.09.019>.
- Merroun, Mohamed, M. Nedelkova, Andre Rossberg, C. Hennig, et Sonja Selenska-Pobell. « Interaction Mechanisms of Bacterial Strains Isolated from Extreme Habitats with Uranium ». *Radiochimica Acta* 94, n° 9-11 (1 novembre 2006): 723-29. <https://doi.org/10.1524/ract.2006.94.9-11.723>.
- Méthé, Barbara A., William D. Hiorns, et Jonathan P. Zehr. « Contrasts between Marine and Freshwater Bacterial Community Composition: Analyses of Communities in Lake George and Six Other Adirondack Lakes ». *Limnology and Oceanography* 43, n° 2

- (1998): 368-74. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.2.0368>.
- Millan, Fanny, Cheilla Izere, Vincent Breton, Olivier Voltaire, David G. Biron, Carlos E. Wetzel, Didier Miallier, Elisabeth Allain, Luc Ector, et Aude Beauger. « The Effect of Natural Radioactivity on Diatom Communities in Mineral Springs ». *Botany Letters* 167, n° 1 (2019): 95-113. <https://doi.org/10.1080/23818107.2019.1691051>.
- Moll, Henry, Falk Lehmann, et Johannes Raff. « Interaction of Curium(III) with Surface-Layer Proteins from *Lysinibacillus Sphaericus JG-A12* ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 190 (1 juin 2020): 110950. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110950>.
- Momčilović, Milan, Jovan Kovačević, Milan Tanić, Milan Đorđević, Goran Bačić, et Snežana Dragović. « Distribution of Natural Radionuclides in Surface Soils in the Vicinity of Abandoned Uranium Mines in Serbia ». *Environmental Monitoring and Assessment* 185, n° 2 (1 février 2013): 1319-29. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2634-9>.
- Mondani, Laure, et Karim Benzerara. « Influence of Uranium on Bacterial Communities: A Comparison of Natural Uranium-Rich Soils with Controls ». *PLoS ONE* 6, n° 10 (2011): 11.
- Mondani, Laure, Karim Benzerara, Marie Carrière, Richard Christen, Yannick Mamindy-Pajany, Laureline Février, Nicolas Marmier, et al. « Influence of Uranium on Bacterial Communities: A Comparison of Natural Uranium-Rich Soils with Controls ». Édité par Vasu D. Appanna. *PLoS ONE* 6, n° 10 (5 octobre 2011): e25771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025771>.
- Montoya, Lilia. « Consortium Diversity of a Sulfate-reducing Biofilm Developed at Acidic PH Influent Conditions in a Down-flow Fluidized Bed Reactor ». Consulté le 5 janvier 2023. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200047>.
- Morrison, Keith D., Mavrik Zavarin, Annie B. Kersting, James D. Begg, Harris E. Mason, Enrica Balboni, et Yongqin Jiao. « Influence of Uranium Concentration and pH on U-Phosphate Biomineralization by *Caulobacter* OR37 ». *Environmental Science & Technology* 55, n° 3 (2 février 2021): 1626-36. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05437>.
- Mumtaz, Saqib, Claire Streten, David L. Parry, Keith A. McGuinness, Ping Lu, et Karen S. Gibb. « Soil Uranium Concentration at Ranger Uranium Mine Land Application Areas Drives Changes in the Bacterial Community ». *Journal of Environmental Radioactivity* 189 (septembre 2018): 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2018.03.003>.
- Mwandira, Wilson, Kazunori Nakashima, Satoru Kawasaki, Allison Arabelo, Kawawa Banda, Imasiku Nyambe, Meki Chirwa, et al. « Biosorption of Pb (II) and Zn (II) from Aqueous Solution by *Oceanobacillus Profundus* Isolated from an Abandoned Mine ». *Scientific Reports* 10, n° 1 (3 décembre 2020): 21189. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78187-4>.
- Nakajima, A., et T. Tsuruta. « Competitive Biosorption of Thorium and Uranium by *Micrococcus Luteus* ». *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 260, n° 1 (2004): 13-18. <https://doi.org/10.1023/B:JRNC.0000027055.16768.1e>.
- Nayak, T., D. De, C. Barman, P. Karmakar, A. Deb, et P. K. Dhal. « Characterization of Indigenous Bacteria from Radon-Rich Groundwater and Their Tolerance to Physicochemical Stress ». *International Journal of Environmental Science and Technology* 17, n° 3 (mars 2020): 1627-36. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02445-w>.
- Nayak, Tilak, Debjit De, Parimal Karmakar, Argha Deb, et Paltu Kumar Dhal. « Microbial Communities of the Drinking Water With Gradient Radon Concentration Are Primarily Contributed by Radon and Heavy Metal Content ». *Frontiers in Environmental Science* 9 (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2021.576400>.
- Nazina, Tamara, Tamara Babich, Nadezhda Kostryukova, Diyana Sokolova, Ruslan Abdullin,

- Tatyana Tourova, Vitaly Kadnikov, et al. « Ultramicrobacteria from Nitrate- and Radionuclide-Contaminated Groundwater ». *Sustainability* 12, n° 3 (janvier 2020): 1239. <https://doi.org/10.3390/su12031239>.
- Nedelkova, Marta, Mohamed L. Merroun, André Rossberg, Christoph Hennig, et Sonja Selenska-Pobell. « *Microbacterium* Isolates from the Vicinity of a Radioactive Waste Depository and Their Interactions with Uranium: Isolates from the Vicinity of a Radioactive Depository ». *FEMS Microbiology Ecology* 59, n° 3 (mars 2007): 694-705. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00261.x>.
- Négrel, Ph, C Guerrot, A Cocherie, M Azaroual, M Brach, et Ch Fouillac. « Rare Earth Elements, Neodymium and Strontium Isotopic Systematics in Mineral Waters: Evidence from the Massif Central, France ». *Applied Geochemistry* 15, n° 9 (octobre 2000): 1345-67. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(00\)00008-1](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(00)00008-1).
- Nevin, Kelly P., Kevin T. Finneran, et Derek R. Lovley. « Microorganisms Associated with Uranium Bioremediation in a High-Salinity Subsurface Sediment ». *Applied and Environmental Microbiology* 69, n° 6 (juin 2003): 3672-75. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3672-3675.2003>.
- Newsome, Laura, Katherine Morris, et Jonathan R. Lloyd. « The Biogeochemistry and Bioremediation of Uranium and Other Priority Radionuclides ». *Chemical Geology* 363 (janvier 2014): 164-84. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.10.034>.
- Newsome, Laura, Katherine Morris, et Jonathan R. Lloyd. « Uranium Biominerals Precipitated by an Environmental Isolate of *Serratia* under Anaerobic Conditions ».   dit   par Paul Jaak Janssen. *PLOS ONE* 10, n° 7 (1 juillet 2015): e0132392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132392>.
- Nicholson, W. L. « Roles of Bacillus Endospores in the Environment ». *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 59, n° 3 (1 mars 2002): 410-16. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8433-7>.
- Nicholson, Wayne L., Nobuo Munakata, Gerda Horneck, Henry J. Melosh, et Peter Setlow. « Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, n° 3 (septembre 2000): 548-72. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>.
- Nie, Xiaoqin, Qiaoya Lin, Faqin Dong, Wencai Cheng, Congcong Ding, Junling Wang, Mingxue Liu, et al. « Surface Biomineralization of Uranium onto *Shewanella Putrefaciens* with or without Extracellular Polymeric Substances ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 241 (1 ao  t 2022): 113719. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113719>.
- Nilgiriwala, Kayzad S., Anuradha Alahari, Amara Sambasiva Rao, et Shree Kumar Apte. « Cloning and Overexpression of Alkaline Phosphatase PhoK from *Sphingomonas* sp. Strain BSAR-1 for Bioprecipitation of Uranium from Alkaline Solutions ». *Applied and Environmental Microbiology* 74, n° 17 (septembre 2008): 5516-23. <https://doi.org/10.1128/AEM.00107-08>.
- Nold, Stephen C, et Gabriel Zwart. « Patterns and Governing Forces in Aquatic Microbial Communities », s. d., 20.
- Nongkhlaw, Macmillan, et Santa Ram Joshi. « Molecular Insight into the Expression of Metal Transporter Genes in *Chryseobacterium* Sp. PMSZPI Isolated from Uranium Deposit ».   dit   par Erika Kothe. *PLOS ONE* 14, n° 5 (23 mai 2019): e0216995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216995>.
- Ort  zar, Maite, Martha E. Trujillo, Brenda Román-Ponce, et Lorena Carro. « *Micromonospora Metallophores*: A Plant Growth Promotion Trait Useful for Bacterial-Assisted Phytoremediation? » *Science of The Total Environment* 739 (15 octobre 2020): 139850. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139850>.

- Osmond, J. K., et M. Ivanovich. « Uranium-Series Mobilization and Surface Hydrology ». *Uranium-Series Disequilibrium: Applications to Earth, Marine, and Environmental Sciences*. 2. Ed, 1992. http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:25066325.
- Ou-yang, Tian, Song-qi Yang, Lu Zhao, Lu-lu Ji, Jun-qiong Shi, et Zhong-xing Wu. « Temporal Heterogeneity of Bacterial Communities and Their Responses to *Raphidiopsis Raciborskii* Blooms ». *Microbiological Research* 262 (1 septembre 2022): 127098. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127098>.
- Oves, Mohammad, Mohammad Saghir Khan, et Almas Zaidi. « Biosorption of Heavy Metals by *Bacillus Thuringiensis* Strain OSM29 Originating from Industrial Effluent Contaminated North Indian Soil ». *Saudi Journal of Biological Sciences* 20, n° 2 (1 avril 2013): 121-29. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.11.006>.
- Özdemir, Sadin, M. Kadir Oduncu, Ersin Kilinc, et Mustafa Soylak. « Tolerance and Bioaccumulation of U(VI) by *Bacillus Mojavensis* and Its Solid Phase Preconcentration by *Bacillus Mojavensis* Immobilized Multiwalled Carbon Nanotube ». *Journal of Environmental Management* 187 (1 février 2017): 490-96. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.004>.
- Pan, Xiaohong, Zhi Chen, Fanbing Chen, Yangjian Cheng, Zhang Lin, et Xiong Guan. « The Mechanism of Uranium Transformation from U(VI) into Nano-Uramphite by Two Indigenous *Bacillus Thuringiensis* Strains ». *Journal of Hazardous Materials* 297 (octobre 2015): 313-19. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.019>.
- Panak, Petra J., R. Knopp, C. H. Booth, et Heino Nitsche. « Spectroscopic Studies on the Interaction of U(VI) with *Bacillus Sphaericus* ». *Radiochimica Acta* 90, n° 9-11 (1 septembre 2002): 779-83. https://doi.org/10.1524/ract.2002.90.9-11_2002.779.
- Pardoux, Romain, Sandrine Sauge-Merle, David Lemaire, Pascale Delangle, Luc Guilloureaux, Jean-Marc Adriano, et Catherine Berthomieu. « Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation ». Édité par Roland Seifert. *PLoS ONE* 7, n° 8 (3 août 2012): e41922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041922>.
- Pathak, Ashish, Rajneesh Jaswal, et Ashvini Chauhan. « Genomic Characterization of a Mercury Resistant *Arthrobacter sp. H-02-3* Reveals the Presence of Heavy Metal and Antibiotic Resistance Determinants ». *Frontiers in Microbiology* 10 (2020). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.03039>.
- Paulino-Lima, Ivan Gláucio, Armando Azua-Bustos, Rafael Vicuña, Carlos González-Silva, Loreto Salas, Lia Teixeira, Alexandre Rosado, Alvaro Augusto da Costa Leitao, et Claudia Lage. « Isolation of UVC-Tolerant Bacteria from the Hyperarid Atacama Desert, Chile ». *Microbial Ecology* 65, n° 2 (1 février 2013): 325-35. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0121-z>.
- Pester, Michael, Frank Maixner, David Berry, Thomas Rattei, Hanna Koch, Sebastian Lückner, Boris Nowka, et al. « *NxrB* Encoding the Beta Subunit of Nitrite Oxidoreductase as Functional and Phylogenetic Marker for Nitrite-Oxidizing *Nitrospira*: Functional and Phylogenetic Marker for *Nitrospira* ». *Environmental Microbiology* 16, n° 10 (octobre 2014): 3055-71. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12300>.
- Pinel-Cabello, M., F. Jroundi, M. López-Fernández, R. Geffers, M. Jarek, R. Jauregui, A. Link, R. Vélchez-Vargas, et M. L. Merroun. « Multisystem Combined Uranium Resistance Mechanisms and Bioremediation Potential of *Stenotrophomonas Bentonitica* BII-R7: Transcriptomics and Microscopic Study ». *Journal of Hazardous Materials* 403 (5 février 2021): 123858. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123858>.
- Powers, Leigh G., Heath J. Mills, Anthony V. Palumbo, Chuanlun Zhang, Kelly Delaney, et Patricia A. Sobczyk. « Introduction of a plasmid-encoded *phoA* gene for constitutive overproduction of alkaline phosphatase in three subsurface *Pseudomonas* isolates ».

- FEMS Microbiology Ecology* 41, n° 2 (1 août 2002): 115-23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00972.x>.
- Prakash, Dhan, Prashant Gabani, Anuj K. Chandel, Zeev Ronen, et Om V. Singh. « Bioremediation: A Genuine Technology to Remediate Radionuclides from the Environment ». *Microbial Biotechnology* 6, n° 4 (2013): 349-60. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12059>.
- Quast, Christian, Elmar Pruesse, Pelin Yilmaz, Jan Gerken, Timmy Schweer, Pablo Yarza, Jörg Peplies, et Frank Oliver Glöckner. « The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools ». *Nucleic Acids Research* 41, n° D1 (1 janvier 2013): D590-96. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- Radeva, Galina, Anelia Kenarova, Velina Bachvarova, Katrin Flemming, Ivan Popov, Dimitar Vassilev, et Sonja Selenska-Pobell. « Bacterial Diversity at Abandoned Uranium Mining and Milling Sites in Bulgaria as Revealed by 16S rRNA Genetic Diversity Study ». *Water, Air, & Soil Pollution* 224, n° 11 (novembre 2013): 1748. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1748-1>.
- Ragon, Marie, Gwendal Restoux, David Moreira, Anders Pape Møller, et Purificación López-García. « Sunlight-Exposed Biofilm Microbial Communities Are Naturally Resistant to Chernobyl Ionizing-Radiation Levels ». Édité par Vishnu Chaturvedi. *PLoS ONE* 6, n° 7 (13 juillet 2011): e21764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021764>.
- Ramachandran, Govindan, Gnanasekaran Chackaravarthi, Govindan Nadar Rajivgandhi, Franck Quero, Muthuchamy Maruthupandy, Naiyf S. Alharbi, Shine Kadaikunnan, Jamal M. Khaled, et Wen-Jun Li. « Biosorption and Adsorption Isotherm of Chromium (VI) Ions in Aqueous Solution Using Soil Bacteria *Bacillus Amyloliquefaciens* ». *Environmental Research* 212 (1 septembre 2022): 113310. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113310>.
- Rangasamy, Anandbabu, Subashchandrabose Gandhi, et Vignesh Tamilchelvan. « Biosorption of Hexavalent Chromium by *Paenibacillus Pabuli* and *Bacillus Cereus* Isolated from Alkaline Industrial Contaminated Soil in Puducherry, India ». *Nature Environment and Pollution Technology* 20, n° 2 (1 juin 2021). <https://doi.org/10.46488/NEPT.2021.v20i02.032>.
- Rappé, Michael S., et Stephen J. Giovannoni. « The Uncultured Microbial Majority ». *Annual Review of Microbiology* 57, n° 1 (2003): 369-94. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759>.
- Rashmi, Vijayaraghavan, Mohandass ShylajaNaciyar, Ramamoorthy Rajalakshmi, Stanley F. D'Souza, Dharmar Prabaharan, et Lakshmanan Uma. « Siderophore Mediated Uranium Sequestration by Marine Cyanobacterium *Synechococcus Elongatus* BDU 130911 ». *Bioresource Technology* 130 (1 février 2013): 204-10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.016>.
- Rastogi, Gurdeep, Shariff Osman, Parag A. Vaishampayan, Gary L. Andersen, Larry D. Stetler, et Rajesh K. Sani. « Microbial Diversity in Uranium Mining-Impacted Soils as Revealed by High-Density 16S Microarray and Clone Library ». *Microbial Ecology* 59, n° 1 (1 janvier 2010): 94-108. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9598-5>.
- Rathnayake, I V N, Mallavarapu Megharaj, Nanthi Bolan, et Ravi Naidu. « Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria ». *International Journal of Civil and Environmental Engineering*, 2010.
- Rathnayake, I.V.N., Mallavarapu Megharaj, G.S.R. Krishnamurti, Nanthi S. Bolan, et Ravi Naidu. « Heavy Metal Toxicity to Bacteria – Are the Existing Growth Media Accurate Enough to Determine Heavy Metal Toxicity? » *Chemosphere* 90, n° 3 (janvier 2013): 1195-1200. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.036>.
- Rawat, Neetika, P. K. Mohapatra, et V. K. Manchanda. « Kinetics of Complexation of Uranium

- with 2-(5-Bromo-2-Pyridylazo)-5-(Diethylamino) Phenol (Br-PADAP) in a 1:1 Water-Ethanol Medium ». *Journal of Solution Chemistry* 35, n° 6 (juin 2006): 803-14. <https://doi.org/10.1007/s10953-006-9027-z>.
- Reitz, Thomas, Andre Rossberg, Astrid Barkleit, Sonja Selenska-Pobell, et Mohamed L. Merroun. « Decrease of U(VI) Immobilization Capability of the Facultative Anaerobic Strain *Paenibacillus Sp. JG-TB8* under Anoxic Conditions Due to Strongly Reduced Phosphatase Activity ». *PLOS ONE* 9, n° 8 (26 août 2014): e102447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102447>.
- Renninger, Neil, Roger Knopp, Heino Nitsche, Douglas S. Clark, et Jay D. Keasling. « Uranyl Precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via Controlled Polyphosphate Metabolism ». *Applied and Environmental Microbiology* 70, n° 12 (décembre 2004): 7404-12. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7404-7412.2004>.
- Ribera, Daniel, Florence Labrot, Gérard Tisnerat, et Jean-François Narbonne. « Uranium in the Environment: Occurrence, Transfer, and Biological Effects ». In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, édité par George W. Ware, 146:53-89. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York, NY: Springer New York, 1996. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8478-6_3.
- Risler, JJ. 1974. Description et classification géologique des sources minérales et thermales du Massif Central [Description and geological classification of the mineral and thermal springs of the Massif Central]. Orléans: Bureau de Recherches Géologiques et Minières, Service des eaux minérales et thermales. Report No: B.R.G.M. 74SGN-418 MCE.
- Rogiers, Tom, Jürgen Claesen, Axel Van Gompel, Nathalie Vanhoudt, Mohamed Mysara, Adam Williamson, Natalie Leys, Rob Van Houdt, Nico Boon, et Kristel Mijndonckx. « Soil Microbial Community Structure and Functionality Changes in Response to Long-Term Metal and Radionuclide Pollution ». *Environmental Microbiology* 23, n° 3 (2021): 1670-83. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15394>.
- Rogiers, Tom, Mohamed L. Merroun, Adam Williamson, Natalie Leys, Rob Van Houdt, Nico Boon, et Kristel Mijndonckx. « *Cupriavidus Metallidurans NA4* Actively Forms Polyhydroxybutyrate-Associated Uranium-Phosphate Precipitates ». *Journal of Hazardous Materials* 421 (5 janvier 2022): 126737. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126737>.
- Rogiers, Tom, Rob Van Houdt, Adam Williamson, Natalie Leys, Nico Boon, et Kristel Mijndonckx. « Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Uranium Resistance ». *Frontiers in Microbiology* 13 (10 mars 2022). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.822197>.
- Rognes, Torbjørn, Tomáš Flouri, Ben Nichols, Christopher Quince, et Frédéric Mahé. « VSEARCH: A Versatile Open Source Tool for Metagenomics ». *PeerJ* 4 (18 octobre 2016): e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>.
- Rohart, Florian, Benoît Gautier, Amrit Singh, et Kim-Anh Lê Cao. « MixOmics: An R Package for ‘omics Feature Selection and Multiple Data Integration ». Édité par Dina Schneidman. *PLOS Computational Biology* 13, n° 11 (3 novembre 2017): e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>.
- Rong, Huang, Qin YiLin, Nie XiaoQin, Dong FaQin, Liu MingXue, Yang Gang, Ma JiaLin, Gong JunYuan, Huang WenBo, et Chen Bo. « The adsorption mechanism and adsorptive products of *Escherichia coli* and uranium (VI) in water. » *China Environmental Science* 36, n° 6 (2016): 1780-87.
- Ruggiero, Christy E., Hakim Boukhalfa, Jennifer H. Forsythe, Joseph G. Lack, Larry E. Hersman, et Mary P. Neu. « Actinide and Metal Toxicity to Prospective Bioremediation Bacteria ». *Environmental Microbiology* 7, n° 1 (janvier 2005): 88-97. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00666.x>.

- Ruiz-Lopez, Sharon, Lynn Foster, Chris Boothman, Nick Cole, Katherine Morris, et Jonathan R. Lloyd. « Identification of a Stable Hydrogen-Driven Microbiome in a Highly Radioactive Storage Facility on the Sellafield Site ». *Frontiers in Microbiology* 11 (2020). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.587556>.
- Ryzhkov, Pavel M., Kai Ostermann, et Gerhard Rödel. « Isolation, Gene Structure, and Comparative Analysis of the S-Layer Gene SslA of *Sporosarcina Ureae* ATCC 13881 ». *Genetica* 131, n° 3 (1 novembre 2007): 255-65. <https://doi.org/10.1007/s10709-006-9135-0>.
- Sack, E.I.w., P.w.j.j. Van Der Wielen, et D. Van Der Kooij. « Utilization of Oligo- and Polysaccharides at Microgram-per-Litre Levels in Freshwater by *Flavobacterium Johnsoniae* ». *Journal of Applied Microbiology* 108, n° 4 (2010): 1430-40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04546.x>.
- Saitou, N, et M Nei. « The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. » *Molecular Biology and Evolution* 4, n° 4 (1 juillet 1987): 406-25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Salbu, Brit. « Speciation of Radionuclides – Analytical Challenges within Environmental Impact and Risk Assessments ». *Journal of Environmental Radioactivity, Radioactivity in the Environment (including the Arctic and Antarctic), The International Conference in Nice, France, 2-6 October 2005*, 96, n° 1 (1 juillet 2007): 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2007.01.028>.
- Salpêtre, Ignace, et Jean-Marie Angel. « Valeurs de référence pour les teneurs en éléments traces dans les eaux de rivières et les sédiments, obtenues en France dans le cadre du nouvel Atlas géochimique européen * (I) ». *Environnement, Risques & Santé* 9, n° 2 (1 mars 2010): 121-35. <https://doi.org/10.1684/ers.2010.0332>.
- Sánchez-Andrea, Irene, Jose Luis Sanz, Martijn F.M. Bijmans, et Alfons J.M. Stams. « Sulfate Reduction at Low PH to Remediate Acid Mine Drainage ». *Journal of Hazardous Materials* 269 (mars 2014): 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.032>.
- Sánchez-Castro, Iván. « Screening of Bacterial Strains Isolated from Uranium Mill Tailings Porewaters for Bioremediation Purposes ». *Journal of Environmental Radioactivity*, 2017, 12.
- Sánchez-Castro, Iván, Pablo Martínez-Rodríguez, Fadwa Jroundi, Pier Lorenzo Solari, Michael Descostes, et Mohamed Larbi Merroun. « High-Efficient Microbial Immobilization of Solved U(VI) by the *Stenotrophomonas* Strain Br8 ». *Water Research* 183 (septembre 2020): 116110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116110>.
- Sani, R, B Peyton, W Smith, Apel Apel, et J Petersen. « Dissimilatory Reduction of Cr(VI), Fe(III), and U(VI) by *Cellulomonas* Isolates ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, n° 1-2 (1 octobre 2002): 192-99. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1069-6>.
- Sarma, Barnali, Celin Acharya, et S. R. Joshi. « Characterization of Metal Tolerant *Serratia* Spp. Isolates from Sediments of Uranium Ore Deposit of Domiasiat in Northeast India ». *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 86, n° 2 (juin 2016): 253-60. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0236-0>.
- Saxena, D., R. Levin, et M.A. Firer. « Removal of Chromate from Industrial Effluent by a New Isolate of *Staphylococcus Cohnii* ». *Water Science and Technology* 42, n° 1-2 (1 juillet 2000): 93-98. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0297>.
- Scapolan, Stéphane. « Chimie de l'uranium en milieux aqueux et sanguin, techniques d'études » *Institut de protection et de sûreté nucléaire, département de protection de la santé de l'homme et de dosimétrie* (novembre 1996), s. d., 115.
- Schmidt, Astrid, André Schmidt, Götz Haferburg, et Erika Kothe. « Superoxide Dismutases of Heavy Metal Resistant *Streptomyces* ». *Journal of Basic Microbiology* 47, n° 1

- (2007): 56-62. <https://doi.org/10.1002/jobm.200610213>.
- Schöner, Angelika. « The Geochemistry of Natural Wetlands in Former Uranium Milling Sites (Eastern Germany) and Its Implications for Uranium Retention », s. d.
- Selvakumar, Rajendran, Govindarajan Ramadoss, Mridula P. Menon, Karuppuli Rajendran, Palanisami Thavamani, Ravi Naidu, et Mallavarapu Megharaj. « Challenges and Complexities in Remediation of Uranium Contaminated Soils: A Review ». *Journal of Environmental Radioactivity* 192 (décembre 2018): 592-603. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2018.02.018>.
- Serkebaeva, Yulia M., Yongkyu Kim, Werner Liesack, et Svetlana N. Dedysh. « Pyrosequencing-Based Assessment of the Bacteria Diversity in Surface and Subsurface Peat Layers of a Northern Wetland, with Focus on Poorly Studied Phyla and Candidate Divisions ». *PLOS ONE* 8, n° 5 (21 mai 2013): e63994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063994>.
- Shang, Yongquan, Xiaoyang Wu, Xibao Wang, Qinguo Wei, Shengchao Ma, Guolei Sun, Huanxin Zhang, Lidong Wang, Huashan Dou, et Honghai Zhang. « Factors Affecting Seasonal Variation of Microbial Community Structure in Hulun Lake, China ». *Science of The Total Environment* 805 (20 janvier 2022): 150294. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150294>.
- Sharma, A., E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, B. Bennett, M. J. Daly, et B. M. Hoffman. « Responses of Mn²⁺ Speciation in *Deinococcus Radiodurans* and *Escherichia Coli* to γ -Radiation by Advanced Paramagnetic Resonance Methods ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, n° 15 (9 avril 2013): 5945-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303376110>.
- Shelobolina, Evgenya S., Hiromi Konishi, Huifang Xu, et Eric E. Roden. « U(VI) Sequestration in Hydroxyapatite Produced by Microbial Glycerol 3-Phosphate Metabolism ». *Applied and Environmental Microbiology* 75, n° 18 (septembre 2009): 5773-78. <https://doi.org/10.1128/AEM.00628-09>.
- Sheng, Ling, et Jeremy B. Fein. « Uranium Adsorption by *Shewanella Oneidensis* MR-1 as a Function of Dissolved Inorganic Carbon Concentration ». *Chemical Geology* 358 (4 novembre 2013): 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.08.039>.
- Sheng, Ling, et Jeremy B. Fein. « Uranium Reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 as a Function of NaHCO₃ Concentration: Surface Complexation Control of Reduction Kinetics ». *Environmental Science & Technology* 48, n° 7 (1 avril 2014): 3768-75. <https://doi.org/10.1021/es5003692>.
- Shukla, Arpit, Paritosh Parmar, et Meenu Saraf. « Radiation, Radionuclides and Bacteria: An in-Perspective Review ». *Journal of Environmental Radioactivity* 180 (1 décembre 2017): 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.09.013>.
- Shuryak, Igor. « Review of Microbial Resistance to Chronic Ionizing Radiation Exposure under Environmental Conditions ». *Journal of Environmental Radioactivity* 196 (janvier 2019): 50-63. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2018.10.012>.
- Simonoff, Monique, Claire Sergeant, Sébastien Poulain, et Michael S. Pravikoff. « Microorganisms and Migration of Radionuclides in Environment ». *Comptes Rendus Chimie* 10, n° 10-11 (octobre 2007): 1092-1107. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2007.02.010>.
- Singh, Jay Prakash, Bhagyashree P. Vaidya, Nina M. Goodey, et Jennifer Adams Krumins. « Soil Microbial Response to Metal Contamination in a Vegetated and Urban Brownfield ». *Journal of Environmental Management* 244 (15 août 2019): 313-19. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.111>.
- Sitte, Jana, Sylvia Löffler, Eva-Maria Burkhardt, Katherine C. Goldfarb, Georg Büchel, Terry C. Hazen, et Kirsten Küsel. « Metals Other than Uranium Affect Microbial

- Community Composition in a Historical Uranium-Mining Site ». *Environmental Science and Pollution Research* 22, n° 24 (décembre 2015): 19326-41. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4791-1>.
- Siunova, T. V., A. V. Siunov, V. V. Kochetkov, et A. M. Boronin. « The Cnr-like Operon in Strain *Comamonas Sp.* Encoding Resistance to Cobalt and Nickel ». *Russian Journal of Genetics* 45, n° 3 (mars 2009): 292-97. <https://doi.org/10.1134/S1022795409030053>.
- Sivaswamy, Vaideeswaran, Maxim I. Boyanov, Brent M. Peyton, Sridhar Viamajala, Robin Gerlach, William A. Apel, Rajesh K. Sani, Alice Dohnalkova, Kenneth M. Kemner, et Thomas Borch. « Multiple Mechanisms of Uranium Immobilization by *Cellulomonas Sp.* Strain ES6 ». *Biotechnology and Bioengineering* 108, n° 2 (février 2011): 264-76. <https://doi.org/10.1002/bit.22956>.
- Slonczewski, Joan L, Erik Foster, et John W Foster,. *Microbiology: An Evolving Science Fifth International Student Edition with Ebook, Smartwork5, Animations, ETopics and EAppendices*. W.W. Norton & Company, 2020.
- Sohrabi, Mehdi. « The State-of-the-Art on Worldwide Studies in Some Environments with Elevated Naturally Occurring Radioactive Materials (NORM) ». *Applied Radiation and Isotopes, Naturally Occurring Radioactive Material in the Environment*, 49, n° 3 (1 mars 1998): 169-88. [https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(97\)00238-8](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(97)00238-8).
- Song, Jianing, Bin Han, Han Song, Jinrong Yang, Lijuan Zhang, Ping Ning, et Zhang Lin. « Nonreductive Biomineralization of Uranium by *Bacillus Subtilis* ATCC–6633 under Aerobic Conditions ». *Journal of Environmental Radioactivity* 208-209 (1 novembre 2019): 106027. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2019.106027>.
- Sowmya, S., P. D. Rekha, et A. B. Arun. « Uranium(VI) Bioprecipitation Mediated by a Phosphate Solubilizing *Acinetobacter Sp.* YU-SS-SB-29 Isolated from a High Natural Background Radiation Site ». *International Biodeterioration & Biodegradation* 94 (1 octobre 2014): 134-40. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.009>.
- Sowmya, S., P.D. Rekha, et A. B. Arun. « Isolation, Identification and Characterization of *Curtobacterium sp.* YU-SS-C-67 for phosphate Solubilization and Uranium Tolerance ». *International Research Journal of Biological Sciences* 2, n° 12 (2013): 102-6.
- Spain, Anne M., et Lee Krumholz. « Cooperation of Three Denitrifying Bacteria in Nitrate Removal of Acidic Nitrate- and Uranium-Contaminated Groundwater ». *Geomicrobiology Journal* 29, n° 9 (1 novembre 2012): 830-42. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.635757>.
- Spain, Anne M., Lee R. Krumholz, et Mostafa S. Elshahed. « Abundance, Composition, Diversity and Novelty of Soil Proteobacteria ». *The ISME Journal* 3, n° 8 (août 2009): 992-1000. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.43>.
- Sprocati, Anna Rosa, Chiara Alisi, Flavia Tasso, Alessia Fiore, Paola Marconi, Francesca Langella, Götz Haferburg, Andrei Nicoara, Aurora Neagoe, et Erika Kothe. « Bioprospecting at Former Mining Sites across Europe: Microbial and Functional Diversity in Soils ». *Environmental Science and Pollution Research* 21, n° 11 (1 juin 2014): 6824-35. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1907-3>.
- Stetten, Lucie, Pascale Blanchart, Arnaud Mangeret, Pierre Lefebvre, Pierre Le Pape, Jessica Brest, Pauline Merrot, et al. « Redox Fluctuations and Organic Complexation Govern Uranium Redistribution from U(IV)-Phosphate Minerals in a Mining-Polluted Wetland Soil, Brittany, France ». *Environmental Science & Technology* 52, n° 22 (20 novembre 2018): 13099-109. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03031>.
- Stevens, Lawrence E., Edward R. Schenk, et Abraham E. Springer. « Springs Ecosystem Classification ». *Ecological Applications: A Publication of the Ecological Society of America* 31, n° 1 (janvier 2021): e2218. <https://doi.org/10.1002/eap.2218>.

- Stubbs, Joanne E., David C. Elbert, David R. Veblen, et Chen Zhu. « Electron Microbeam Investigation of Uranium-Contaminated Soils from Oak Ridge, TN, USA ». *Environmental Science & Technology* 40, n° 7 (avril 2006): 2108-13. <https://doi.org/10.1021/es0518676>.
- Suhr, Matthias, Nancy Unger, Karen E. Viacava, Tobias J. Günther, Johannes Raff, et Katrin Pollmann. « Investigation of Metal Sorption Behavior of Srp1 from *Lysinibacillus Sphaericus* JG-B53: A Combined Study Using QCM-D, ICP-MS and AFM ». *BioMetals* 27, n° 6 (1 décembre 2014): 1337-49. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9794-8>.
- Sun, Xiaoxu, Benru Song, Rui Xu, Miaomiao Zhang, Pin Gao, Hanzhi Lin, et Weimin Sun. « Root-Associated (Rhizosphere and Endosphere) Microbiomes of the Miscanthus Sinensis and Their Response to the Heavy Metal Contamination ». *Journal of Environmental Sciences* 104 (1 juin 2021): 387-98. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.12.019>.
- Suriya, Jayaraman, Mootapally Chandra Shekar, Neelam Mustakali Nathani, Thangaiyan Suganya, Subramanian Bharathiraja, et Muthukalingan Krishnan. « Assessment of Bacterial Community Composition in Response to Uranium Levels in Sediment Samples of Sacred Cauvery River ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, n° 2 (janvier 2017): 831-41. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7945-2>.
- Sutcliffe, B., G.C. Hose, A.J. Harford, D.J. Midgley, P. Greenfield, I.T. Paulsen, et A.A. Chariton. « Microbial Communities Are Sensitive Indicators for Freshwater Sediment Copper Contamination ». *Environmental Pollution* 247 (avril 2019): 1028-38. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.104>.
- Sutcliffe, Brodie, Anthony A Chariton, Andrew J Harford, Grant C Hose, Paul Greenfield, Liam D H Elbourne, Yalchin Oytam, Sarah Stephenson, David J Midgley, et Ian T Paulsen. « Effects of Uranium Concentration on Microbial Community Structure and Functional Potential ». *Environmental Microbiology*, 2017, 19.
- Suzuki, Daisuke, Zhiling Li, Xinxin Cui, Chunfung Zhang, et Arata Katayama. « Reclassification of *Desulfobacterium Anilini* as *Desulfatiglans Anilini* Comb. Nov. within *Desulfatiglans* Gen. Nov., and Description of a 4-Chlorophenol-Degrading Sulfate-Reducing Bacterium, *Desulfatiglans Parachlorophenolica* Sp. Nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, n° Pt_9 (1 septembre 2014): 3081-86. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.064360-0>.
- Suzuki, Yohey, et Jillian F. Banfield. « Resistance to, and Accumulation of, Uranium by Bacteria from a Uranium-Contaminated Site ». *Geomicrobiology Journal* 21, n° 2 (mars 2004): 113-21. <https://doi.org/10.1080/01490450490266361>.
- Suzuki, Yohey, Shelly D. Kelly, Ken M. Kemner, et Jillian F. Banfield. « Enzymatic U(VI) Reduction by *Desulfosporosinus* Species ». *Radiochimica Acta* 92, n° 1 (1 janvier 2004): 11-16. <https://doi.org/10.1524/ract.92.1.11.25404>.
- Suzuki, Yohey, et Takeshi Suko. « Geomicrobiological Factors That Control Uranium Mobility in the Environment: Update on Recent Advances in the Bioremediation of Uranium-Contaminated Sites ». *Journal of Mineralogical and Petrological Sciences* 101, n° 6 (2006): 299-307. <https://doi.org/10.2465/jmps.060322>.
- Swer, Pynskhem Bok, Santa Ram Joshi, et Celin Acharya. « Cesium and Strontium Tolerant *Arthrobacter* Sp. Strain KMSZP6 Isolated from a Pristine Uranium Ore Deposit ». *AMB Express* 6, n° 1 (13 septembre 2016): 69. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0247-3>.
- Tang, Chuiyun, Juan Zhong, Ying Lv, Xingyu Liu, Yongbin Li, Mingjiang Zhang, Xiao Yan, et Weimin Sun. « Response and Dynamic Change of Microbial Community during Bioremediation of Uranium Tailings by *Bacillus* Sp. » *Minerals* 11, n° 9 (septembre 2021): 967. <https://doi.org/10.3390/min11090967>.

- Tawfik, Zahira, Mohamed Abu-Shady, et Mohamed Haytham. « Uranium Uptake by Some Locally Isolated and Some Reference Bacterial Species ». *Acta Pharm.*, 2005, 13.
- Taylor-Robinson, David, et Jørgen Skov Jensen. « Mycoplasma genitalium: from Chrysalis to Multicolored Butterfly ». *Clinical Microbiology Reviews* 24, n° 3 (juillet 2011): 498-514. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-11>.
- Theodorakopoulos, Nicolas, Virginie Chapon, Frédéric Coppin, Magali Floriani, Thomas Vercouter, Claire Sergeant, Virginie Camilleri, Catherine Berthomieu, et Laureline Février. « Use of Combined Microscopic and Spectroscopic Techniques to Reveal Interactions between Uranium and *Microbacterium Sp. A9*, a Strain Isolated from the Chernobyl Exclusion Zone ». *Journal of Hazardous Materials* 285 (mars 2015): 285-93. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.018>.
- Theodorakopoulos, Nicolas, Laureline Février, Mohamed Barakat, Philippe Ortet, Richard Christen, Laurie Piette, Sviatoslav Levchuk, et al. « Soil Prokaryotic Communities in Chernobyl Waste Disposal Trench T22 Are Modulated by Organic Matter and Radionuclide Contamination ». *FEMS Microbiology Ecology* 93, n° 8 (1 août 2017). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix079>.
- Thomas, François, Jan-Hendrik Hehemann, Etienne Rebuffet, Mirjam Czjzek, et Gurvan Michel. « Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection ». *Frontiers in Microbiology* 2 (2011). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00093>.
- Thompson, Julie D., Desmond G. Higgins, et Toby J. Gibson. « CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice ». *Nucleic Acids Research* 22, n° 22 (11 novembre 1994): 4673-80. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Thorgersen, Michael P., W. Andrew Lancaster, Lara Rajeev, Xiaoxuan Ge, Brian J. Vaccaro, Farris L. Poole, Adam P. Arkin, Aindrila Mukhopadhyay, et Michael W. W. Adams. « A Highly Expressed High-Molecular-Weight S-Layer Complex of *Pelosinus sp.* Strain UFO1 Binds Uranium ». *Applied and Environmental Microbiology* 83, n° 4 (1 février 2017): e03044-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03044-16>.
- Tsuruta, T. « Bioaccumulation of Uranium and Thorium from the Solution Containing Both Elements Using Various Microorganisms ». *Journal of Alloys and Compounds*, Proceedings of Rare Earths'04 in Nara, Japan, 408-412 (9 février 2006): 1312-15. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2005.04.131>.
- Tsuruta, Takehiko. « Adsorption of Uranium from Acidic Solution by Microbes and Effect of Thorium on Uranium Adsorption by *Streptomyces Levoris* », s. d., 3.
- Tyupa, Dmitry V., Sergei V. Kalenov, Dmitry A. Skladnev, Nikolay S. Khokhlachev, Marina M. Baurina, et Alexander Ye. Kuznetsov. « Toxic Influence of Silver and Uranium Salts on Activated Sludge of Wastewater Treatment Plants and Synthetic Activated Sludge Associates Modeled on Its Pure Cultures ». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38, n° 1 (1 janvier 2015): 125-35. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1250-1>.
- Upstone, Stephen L. « Ultraviolet/Visible Light Absorption Spectrophotometry in Clinical Chemistry ». In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, édité par Robert A. Meyers, a0547. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0547>.
- Volland, Jean-Marie, Silvina Gonzalez-Rizzo, Olivier Gros, Tomáš Týmł, Natalia Ivanova, Frederik Schulz, Danielle Goudeau, et al. « A centimeter-long bacterium with DNA contained in metabolically active, membrane-bound organelles ». *Science* 376, n° 6600 (24 juin 2022): 1453-58. <https://doi.org/10.1126/science.abb3634>.
- Wan, Jiamin, Wenming Dong, et Tetsu K. Tokunaga. « Method to Attenuate U(VI) Mobility in Acidic Waste Plumes Using Humic Acids ». *Environmental Science & Technology* 45,

- n° 6 (15 mars 2011): 2331-37. <https://doi.org/10.1021/es103864t>.
- Wang, Binhao, Xiafei Zheng, Hangjun Zhang, Fanshu Xiao, Hang Gu, Keke Zhang, Zhili He, Xiang Liu, et Qingyun Yan. « Bacterial Community Responses to Tourism Development in the Xixi National Wetland Park, China ». *Science of The Total Environment* 720 (10 juin 2020): 137570. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137570>.
- Wang, Gongting, Xin Zhao, Wenqing Luo, Junjun Yuan, Yali Guo, Xiaonan Ji, Wei Hu, Min Li, et Zedong Teng. « Noval Porous Phosphate-Solubilizing Bacteria Beads Loaded with BC/NZVI Enhanced the Transformation of Lead Fractions and Its Microecological Regulation Mechanism in Soil ». *Journal of Hazardous Materials* 437 (5 septembre 2022): 129402. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129402>.
- Wang, Han, Yufei Zeng, Chuling Guo, Yanping Bao, Guining Lu, John R. Reinfelder, et Zhi Dang. « Bacterial, Archaeal, and Fungal Community Responses to Acid Mine Drainage-Laden Pollution in a Rice Paddy Soil Ecosystem ». *Science of The Total Environment* 616-617 (1 mars 2018): 107-16. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.224>.
- Wang, Yong, et Pei-Yuan Qian. « Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies ». *PLOS ONE* 4, n° 10 (9 octobre 2009): e7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>.
- Wang, Yuheng, Alexandre Bagnoud, Elena Suvorova, Eric McGivney, Lydie Chesaux, Vannapha Phrommavanh, Michael Descostes, et Rizlan Bernier-Latmani. « Geochemical Control on Uranium(IV) Mobility in a Mining-Impacted Wetland ». *Environmental Science & Technology* 48, n° 17 (2 septembre 2014): 10062-70. <https://doi.org/10.1021/es501556d>.
- Wei, Yali, Zhi Chen, Han Song, Jian Zhang, Zhang Lin, Zhi Dang, et Hong Deng. « The Immobilization Mechanism of U(VI) Induced by *Bacillus Thuringiensis* 016 and the Effects of Coexisting Ions ». *Biochemical Engineering Journal* 144 (avril 2019): 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.01.013>.
- Weidler, Gerhard W., Marion Dornmayr-Pfaffenhuemer, Friedrich W. Gerbl, Wolfgang Heinen, et Helga Stan-Lotter. « Communities of Archaea and Bacteria in a Subsurface Radioactive Thermal Spring in the Austrian Central Alps, and Evidence of Ammonia-Oxidizing Crenarchaeota ». *Applied and Environmental Microbiology* 73, n° 1 (janvier 2007): 259-70. <https://doi.org/10.1128/AEM.01570-06>.
- Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et Lane D J. « 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study ». *Journal of Bacteriology* 173, n° 2 (1 janvier 1991): 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
- Wildung, R. E., Y. A. Gorby, K. M. Krupka, N. J. Hess, S. W. Li, A. E. Plymale, J. P. McKinley, et J. K. Fredrickson. « Effect of Electron Donor and Solution Chemistry on Products of Dissimilatory Reduction of Technetium by *Shewanella putrefaciens* ». *Applied and Environmental Microbiology* 66, n° 6 (juin 2000): 2451-60.
- Williams, Kenneth H, John R Bargar, Jonathan R Lloyd, et Derek R Lovley. « Bioremediation of Uranium-Contaminated Groundwater: A Systems Approach to Subsurface Biogeochemistry ». *Current Opinion in Biotechnology, Energy biotechnology • Environmental biotechnology*, 24, n° 3 (1 juin 2013): 489-97. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.008>.
- Williamson, Adam J., Florian Verbruggen, Vania S. Chavez Rico, Jef Bergmans, Jeroen Spooren, Lourdes Yurramendi, Gijs Du Laing, Nico Boon, et Tom Hennebel. « Selective Leaching of Copper and Zinc from Primary Ores and Secondary Mineral Residues Using Biogenic Ammonia ». *Journal of Hazardous Materials* 403 (février 2021): 123842. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123842>.

- Woolfolk, C. A., et H. R. Whiteley. « Reduction of inorganic compounds with molecular hydrogen by micrococcus lactilyticus i ». *Journal of Bacteriology* 84, n° 4 (octobre 1962): 647-58. <https://doi.org/10.1128/jb.84.4.647-658.1962>.
- Xiao, Wendan, Xuezhong Ye, Xiaoe Yang, Zhiqiang Zhu, Caixia Sun, Qi Zhang, et Ping Xu. « Isolation and characterization of chromium(VI)-reducing *Bacillus* sp. FY1 and *Arthrobacter* sp. WZ2 and their bioremediation potential ». *Bioremediation Journal* 21, n° 2 (3 avril 2017): 100-108. <https://doi.org/10.1080/10889868.2017.1282939>.
- Xie, Shuibo, Jing Yang, Chao Chen, Xiaojian Zhang, Qingliang Wang, et Chun Zhang. « Study on Biosorption Kinetics and Thermodynamics of Uranium by *Citrobacter Freudii* ». *Journal of Environmental Radioactivity* 99, n° 1 (1 janvier 2008): 126-33. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2007.07.003>.
- Xu, Meiying, Wei-Min Wu, Liyou Wu, Zhili He, Joy D. Van Nostrand, Ye Deng, Jian Luo, et al. « Responses of Microbial Community Functional Structures to Pilot-Scale Uranium in Situ Bioremediation ». *The ISME Journal* 4, n° 8 (août 2010): 1060-70. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.31>.
- Xu, Zheng, Jason N. Woodhouse, Shu Harn Te, Karina Yew-Hoong Gin, Yiliang He, Cong Xu, et Lei Chen. « Seasonal Variation in the Bacterial Community Composition of a Large Estuarine Reservoir and Response to Cyanobacterial Proliferation ». *Chemosphere* 202 (juillet 2018): 576-85. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.037>.
- Yajie, Liu, Saad Munir, Xu Lingling, et Hua Fang. « Comparison of Uranium Extraction by Bio-Product of 3 Bacteria Strains Isolated from Shihongtan Uranium Deposit, Xinjiang, China ». *Pacific International Journal* 2, n° 2 (30 juin 2019): 64-69. <https://doi.org/10.55014/pij.v2i2.68>.
- Yan, Tingfen, Matthew W. Fields, Liyou Wu, Yuangang Zu, James M. Tiedje, et Jizhong Zhou. « Molecular Diversity and Characterization of Nitrite Reductase Gene Fragments (NirK and NirS) from Nitrate- and Uranium-Contaminated Groundwater ». *Environmental Microbiology* 5, n° 1 (2003): 13-24. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00393.x>.
- Yan, Xun, et Xuegang Luo. « Radionuclides Distribution, Properties, and Microbial Diversity of Soils in Uranium Mill Tailings from Southeastern China ». *Journal of Environmental Radioactivity* 139 (janvier 2015): 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.09.019>.
- Yan, Xun, Xuegang Luo, et Min Zhao. « Metagenomic Analysis of Microbial Community in Uranium-Contaminated Soil ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, n° 1 (janvier 2016): 299-310. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7003-5>.
- Yang, Cheng, Zhuo Zeng, Yuanyuan Wang, Guangyi He, Yuansi Hu, Dongdong Gao, Yonghong Dai, Qingyu Li, et Han Zhang. « Ecological Risk Assessment and Identification of the Distinct Microbial Groups in Heavy Metal-Polluted River Sediments ». *Environmental Geochemistry and Health*, 8 août 2022. <https://doi.org/10.1007/s10653-022-01343-4>.
- Yao, Yang, Liang Hu, Shuzhen Li, Qiang Zeng, Hui Zhong, et Zhiguo He. « Exploration on the Bioreduction Mechanisms of Cr(VI) and Hg(II) by a Newly Isolated Bacterial Strain *Pseudomonas Umsongensis* CY-1 ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 201 (15 septembre 2020): 110850. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110850>.
- Yuan, Junjun, Xin Zhao, Xinyu Cao, Gongting Wang, Yali Guo, Xiaonan Ji, Wei Hu, et Min Li. « Effects and Mechanisms of Phosphate Solubilizing Bacteria on Enhancing Phytoextraction of Lead from Contaminated Soil by *Celosia Cristata* L. ». *Journal of Cleaner Production* 380 (20 décembre 2022): 135013. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135013>.
- Yuan, Yihui, Qiuhan Yu, Shuo Yang, Jun Wen, Zhanhu Guo, Xiaolin Wang, et Ning Wang. « Ultrafast Recovery of Uranium from Seawater by *Bacillus Velezensis* Strain UUS-1 with Innate Anti-Biofouling Activity ». *Advanced Science* 6, n° 18 (2019): 1900961.

- <https://doi.org/10.1002/advs.201900961>.
- Yung, Mimi C., et Yongqin Jiao. « Biomineralization of Uranium by PhoY Phosphatase Activity Aids Cell Survival in *Caulobacter crescentus* ». *Applied and Environmental Microbiology* 80, n° 16 (15 août 2014): 4795-4804. <https://doi.org/10.1128/AEM.01050-14>.
- Yung, Mimi C., Jincai Ma, Michelle R. Salemi, Brett S. Phinney, Grant R. Bowman, et Yongqin Jiao. « Shotgun Proteomic Analysis Unveils Survival and Detoxification Strategies by *Caulobacter crescentus* during Exposure to Uranium, Chromium, and Cadmium ». *Journal of Proteome Research* 13, n° 4 (4 avril 2014): 1833-47. <https://doi.org/10.1021/pr400880s>.
- Zadel, Urška, Joseph Nesme, Bernhard Michalke, Gisle Vestergaard, Grażyna A. Płaza, Peter Schröder, Viviane Radl, et Michael Schloter. « Changes Induced by Heavy Metals in the Plant-Associated Microbiome of *Miscanthus x Giganteus* ». *Science of The Total Environment* 711 (1 avril 2020): 134433. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134433>.
- Zavodska, Lucia, et Eva Kosorinova. « Environmental Chemistry of Uranium », s. d., 19.
- Zeng, Taotao, Guanhai Mo, Qing Hu, Guohua Wang, Wei Liao, et Shuibo Xie. « Microbial Characteristic and Bacterial Community Assessment of Sediment Sludge upon Uranium Exposure ». *Environmental Pollution* 261 (1 juin 2020): 114176. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114176>.
- Zhang, Jian, Han Song, Zhi Chen, Shasha Liu, Yali Wei, Jingyi Huang, Chuling Guo, Zhi Dang, et Zhang Lin. « Biomineralization Mechanism of U(VI) Induced by *Bacillus Cereus* 12-2: The Role of Functional Groups and Enzymes ». *Chemosphere* 206 (septembre 2018): 682-92. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.181>.
- Zhang, Xue, Bo Tu, Li-rong Dai, Paul A. Lawson, Zhen-zhen Zheng, Lai-Yan Liu, Yu Deng, Hui Zhang, et LeiYR 2018 Cheng. « *Petroclostridium xylanilyticum* gen. nov., sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from an oilfield, and reclassification of clostridial cluster III members into four novel genera in a new Hungateiclostridiaceae fam. nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, n° 10 (s. d.): 3197-3211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002966>.
- Zheng, Fuchao, Tiange Zhang, Shenglai Yin, Ge Qin, Jun Chen, Jinghua Zhang, Dehua Zhao, Xin Leng, Shuqing An, et Lu Xia. « Comparison and Interpretation of Freshwater Bacterial Structure and Interactions with Organic to Nutrient Imbalances in Restored Wetlands ». *Frontiers in Microbiology* 13 (21 septembre 2022): 946537. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.946537>.
- Ziller, Antoine, et Laurence Fraissinet-Tachet. « Metallothionein Diversity and Distribution in the Tree of Life: A Multifunctional Protein ». *Metallomics* 10, n° 11 (2018): 1549-59. <https://doi.org/10.1039/C8MT00165K>.
- Zillig, Wolfram. « Comparative Biochemistry of Archaea and Bacteria ». *Current Opinion in Genetics & Development* 1, n° 4 (1 décembre 1991): 544-51. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(05\)80206-0](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(05)80206-0).
- Zirnstein, Isabel, Thuro Arnold, Evelyn Krawczyk-Bärsch, Ulf Jenk, Gert Bernhard, et Isolde Röske. « Eukaryotic Life in Biofilms Formed in a Uranium Mine ». *MicrobiologyOpen* 1, n° 2 (juin 2012): 83-94. <https://doi.org/10.1002/mbo3.17>.
- Zou, L., Z. Chen, X. Zhang, P. Liu, et X. Li. « Phosphate Promotes Uranium (VI) Adsorption in *Staphylococcus Aureus* LZ-01 ». *Letters in Applied Microbiology* 59, n° 5 (2014): 528-34. <https://doi.org/10.1111/lam.12310>.

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de cultures utilisés pour la culture bactérienne

1) Composition du milieu de culture Tryptic Soja Broth (TSB)

Tableau 22 : Composition du milieu Tryptic Soja Broth par litre d'eau

Composés	Concentration (g/L)
Bacto Tryptone (digestion pancréatique de caséine)	17
Bacto Soytone (digestion peptique de semoule de soja)	3
Glucose (dextrose)	2,5
Chlorure de sodium	5
Phosphate bipotassique d'hydrogène	2,5

2) Composition du milieu Luria-Bertani (LB)

Tableau 23 : Composition du milieu Luria-Bertani par litre d'eau

Composés	Concentration (g/L)
Peptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	10

3) Composition du milieu « Freshwater Minimal Medium » (FMM)

Tableau 24 : Composition du milieu Freshwater minimal medium (FMM) par litre d'eau

Composés	Concentration (g/L)
NaHCO ₃	2,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
KCl	0,1
NH ₄ Cl	1,5
β-glycerophosphate (FMM 1) ou sodium Trimetaphosphate (FMM 2)	0,0162 ou 0,0214
Fumarate	0,08
Solution Oligo-éléments	10 ml
Solution vitamines	10 ml

Tableau 25 : Solution Oligo-éléments

Composés	Concentration (g/L)
Acide nitrilotriacétique	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	3
MnSO ₄ .2H ₂ O	0,45
NaCl	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,18
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,18
CuSO ₄	0,01
AlK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	0,02
H ₃ BO ₃	0,01
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,01

Tableau 26 : Solution vitamines

Composés	Concentration (mg/L)
Biotine	2
Acide folique	2
Pyridoxin hydrochloride	10
Thiamine hydrochloride	5
Riboflavine	5
Acide nicotinique	5
DL-calcium pantothenate	5
Vitamine B12	0,1
Acide p-Amin benzoïque	5
Acide lipoïque	5

Annexe 2 : Corrélation entre les OTUs spécifiques et les paramètres physicochimiques dans la carotte de Rophin (2020)

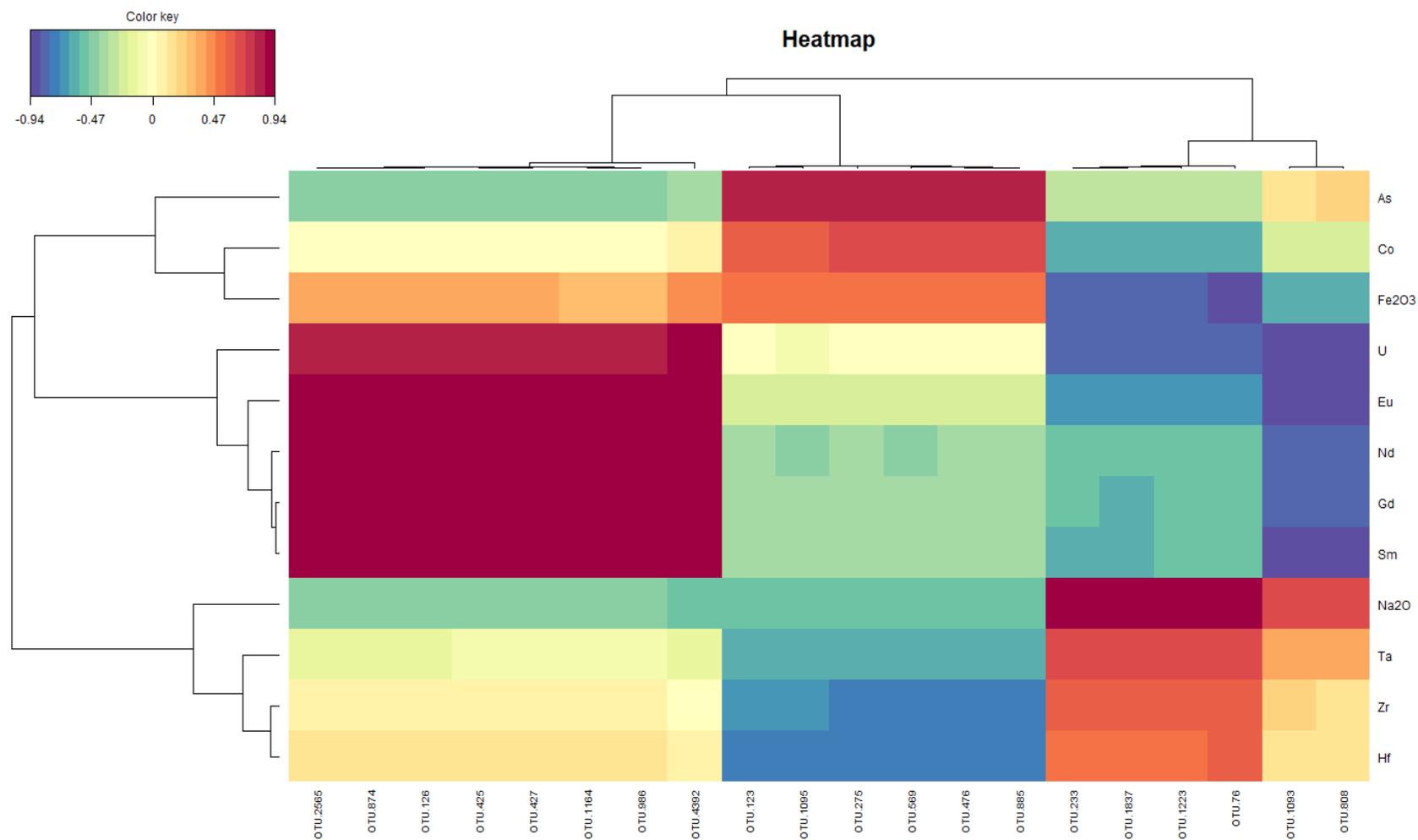


Figure 71 : Heatmap de la sPLS réalisée sur les données d'OTUs spécifiques et des paramètres physicochimiques de la carotte prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin en 2020

Annexe 3 : Isolement de souches bactériennes provenant d'une carotte de sol prélevée dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin

La culture bactérienne a été réalisée à partir des échantillons de sols prélevés dans la carotte échantillonnée en juin 2021 dans la zone humide à l'aval de l'ancien site minier de Rophin. Une analyse des éléments traces et majeurs des différents horizons de la carotte de sol de juin 2021 a été réalisée au laboratoire IPHC à Strasbourg par ICP-OES et ICP-MS. Ces fortes concentrations en éléments traces métalliques et radioéléments, en particulier dans la zone blanche (ZB), peuvent entraîner une pression de sélection sur les populations bactériennes conduisant à l'apparition de souches résistantes aux métaux et radioéléments. Les souches bactériennes cultivées dans cette carotte de sol seront de bonnes candidates pour comprendre les mécanismes d'interactions avec l'uranium mis en place par ces bactéries pour s'y développer.

1) Isolement et identification des bactéries provenant des différents horizons de sols échantillonnés

Les différents échantillons de sol ont été mis en culture sur 2 milieux nutritifs (LB et TSB), afin d'obtenir une large gamme de bactéries présentes le long de cette carotte. Au total, 400 souches bactériennes ont été isolées dans cette carotte de sol, correspondant à 119 OTUs identifiées, réparties sur 4 phylums. Les deux histogrammes ci-dessous représentent le nombre de souches isolées et le nombre d'OTUs identifiées par couche de sol (Figure 72.a), puis l'abondance relative de chaque phylum dans chaque horizon de sol (Figure 72.b).

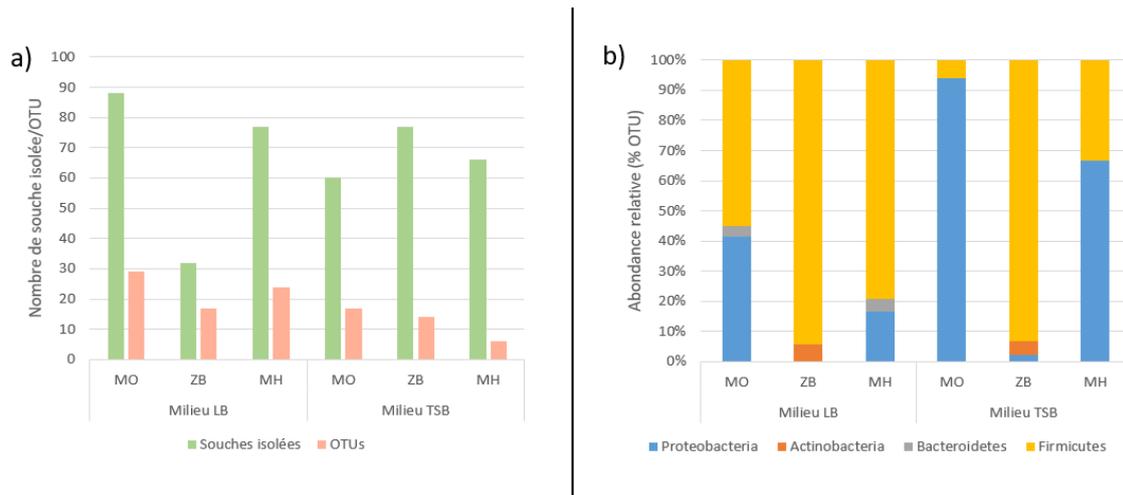


Figure 72: a) Nombre de souches isolées et nombre d'OTUs obtenues dans chaque couche de sol; b) Abondance relative (%) de chaque phylum obtenu pour chaque horizon de sol échantillonné

Les isolats de cette carotte de sol prélevée dans la zone humide de Rophin sont associés à 4 phylums : *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* et *Firmicutes*. Ces phylums sont généralement identifiés et isolés dans des environnements contaminés en radioéléments (Chapon et al., 2012 ; Islam et Par., 2011 ; Sánchez-Castro et al., 2017 ; Suriya et al., 2017). La plupart des isolats appartenait au phylum des *Firmicutes*, en particulier dans la zone blanche. Au total, le phylum des *Firmicutes* regroupent 86 OTUs, avec des isolats majoritairement associés au genre *Bacillus* (44 OTUs) et *Paenibacillus* (26 OTUs) mais également aux espèces *Cohnella sp*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Oceanobacillus sp.*, *Paludirhabdus telluriireducen*, *Psychrobacillus vulpis*, *Staphylococcus cohnii* et *Viridibacillus arenosi*. Le phylum des *Proteobacteria* est détecté dans tous les horizons de sols échantillonnés et principalement dans la couche MO. Au total, les *Proteobacteria* regroupent 27 OTUs avec des isolats apparentés à 3 classe : *Alphaproteobacteria* représentée par 2 OTUs appartenant aux espèces *Novosphingobium sp.* et *Sphingomonas sp.* ; *Betaproteobacteria* avec 1 OTU appartenant à l'espèce *Aquitalea aquatilis* ; et *Gammaproteobacteria* dont 24 OTUs sont associées principalement au genre *Pseudomonas* (*Pseudomonas asplenii*, *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas umsongensis* et *Pseudomonas vancouverensis*). Par la suite, le phylum des *Actinobacteria* a été uniquement détecté dans la couche ZB avec des OTUs associées à *Arthrobacter agilis*, *Curtobacterium flaccumfaciens* et *Micromonospora sp.* Enfin, des isolats appartenant au phylum des *Bacteroidetes* ont été uniquement détectés dans la couche MO (1 OTU) et MH (1 OTU) par culture avec le milieu LB. Ces deux OTUs sont apparentés à l'espèce *Myroides sp.* Les différents arbres phylogénétiques obtenus pour chaque horizon de sol, pour les deux milieux cultures (LB et TSB), sont donnés ci-dessous :

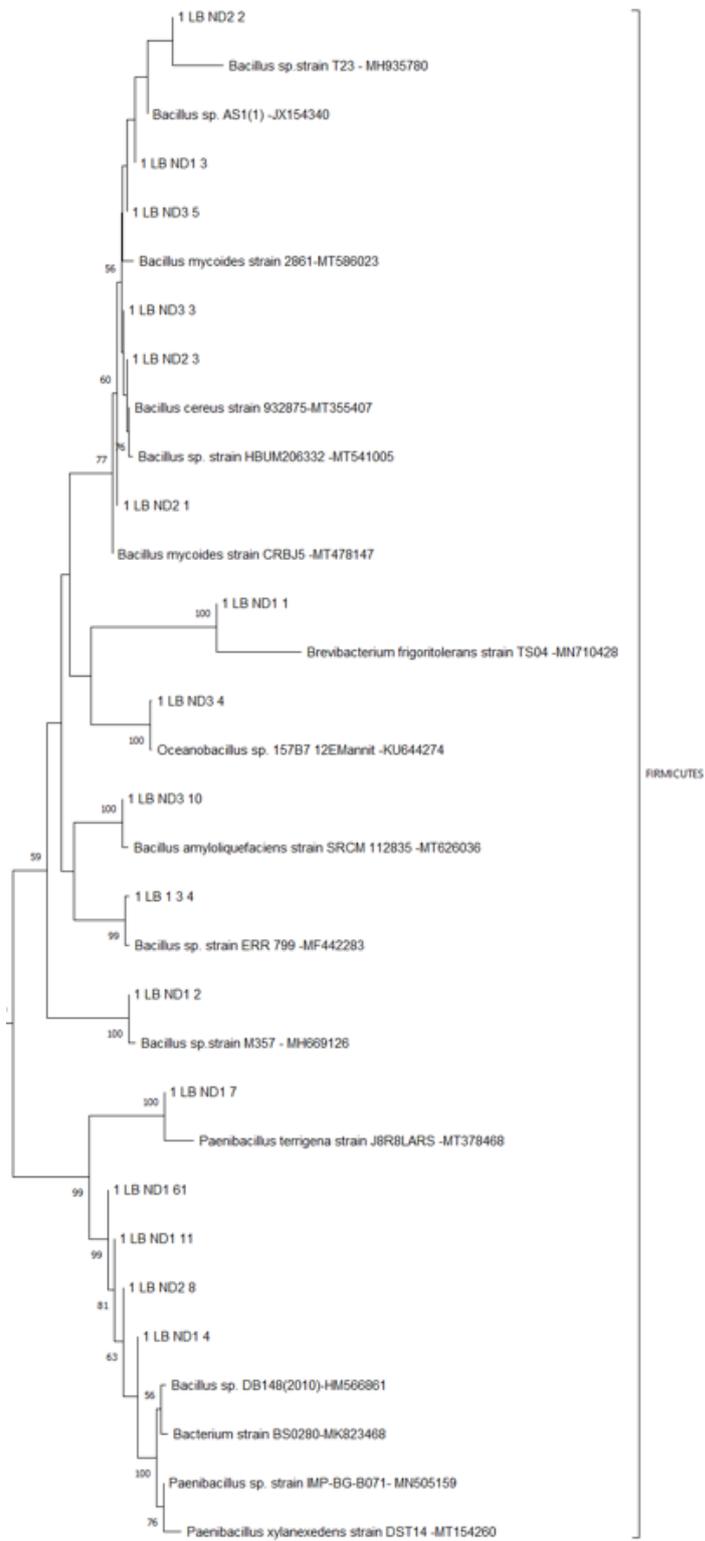


Figure 73 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche MO à partir du milieu LB : Firmicutes

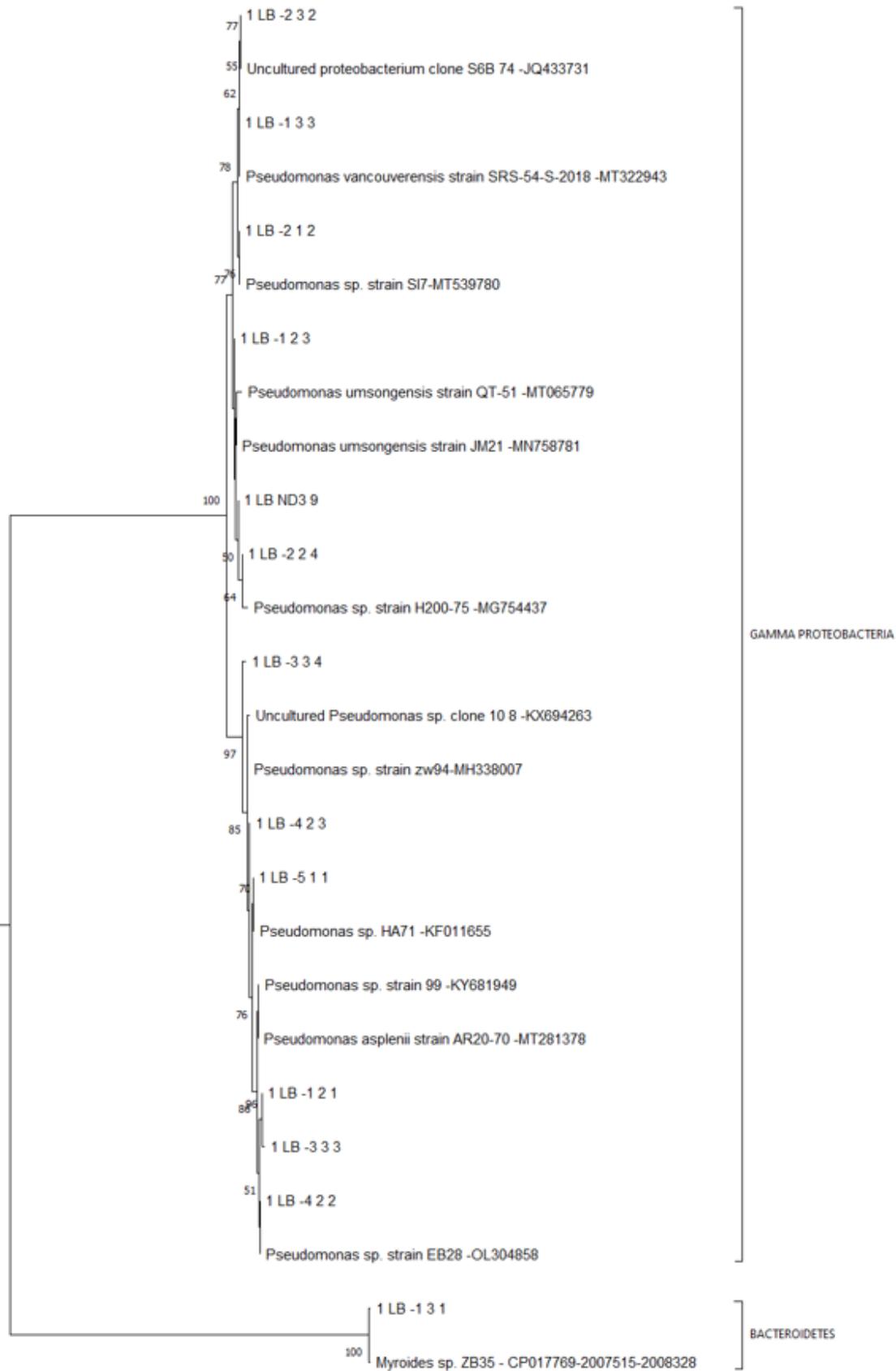


Figure 74 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche MO à partir du milieu LB : Proteobacteria et Bacteroidetes

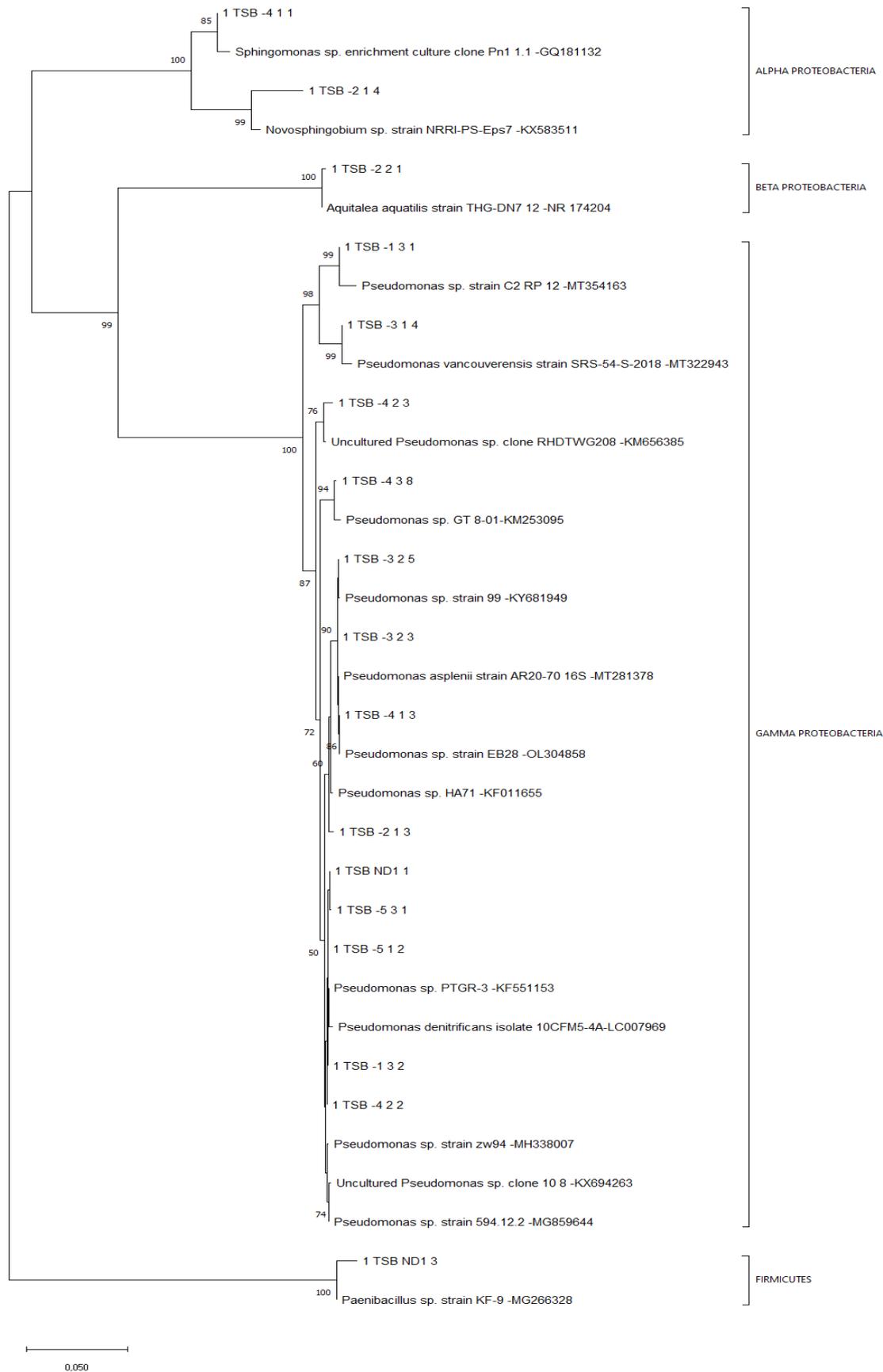


Figure 75 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche MO à partir du milieu TSB

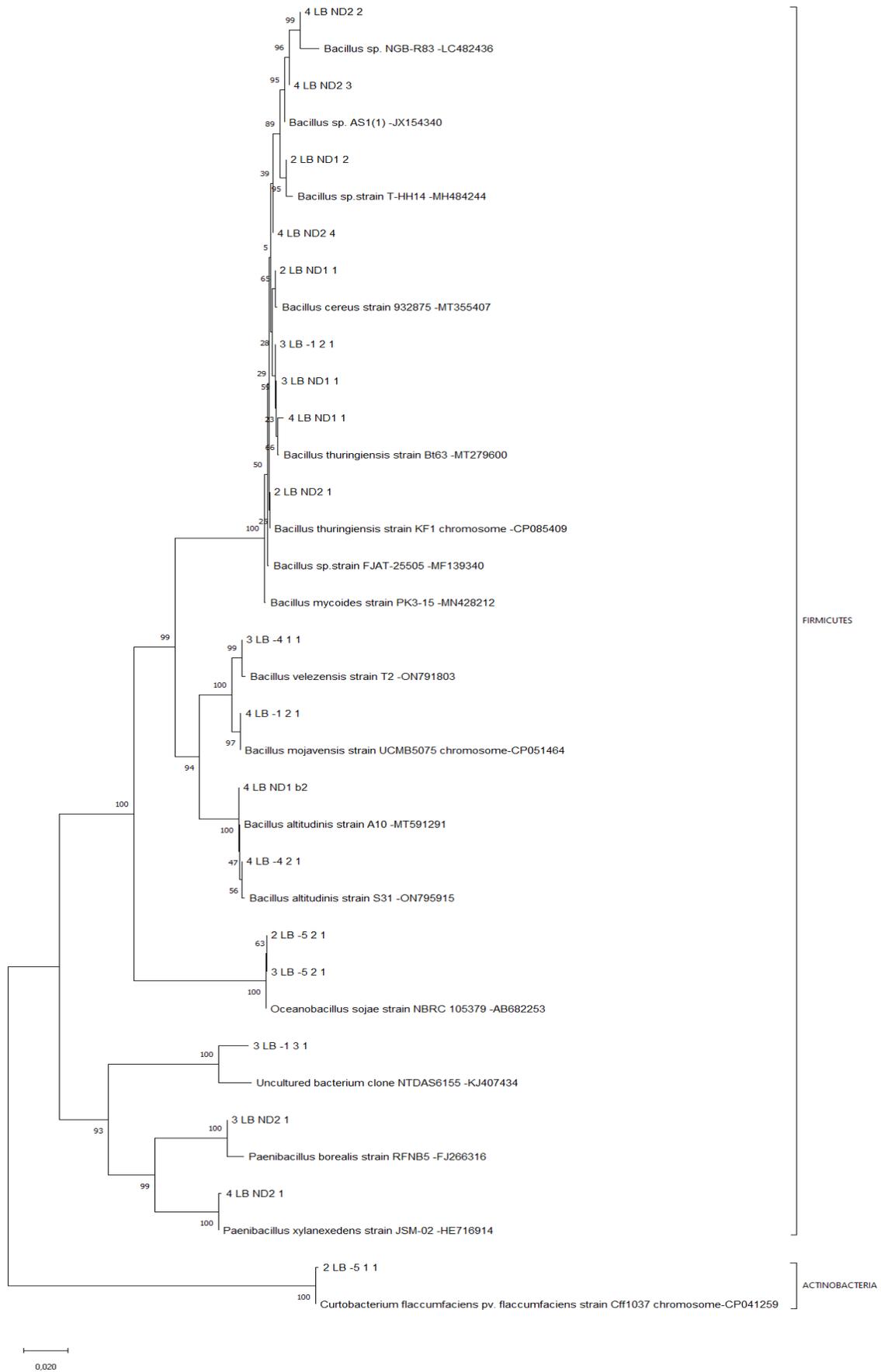


Figure 76 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche ZB à partir du milieu LB

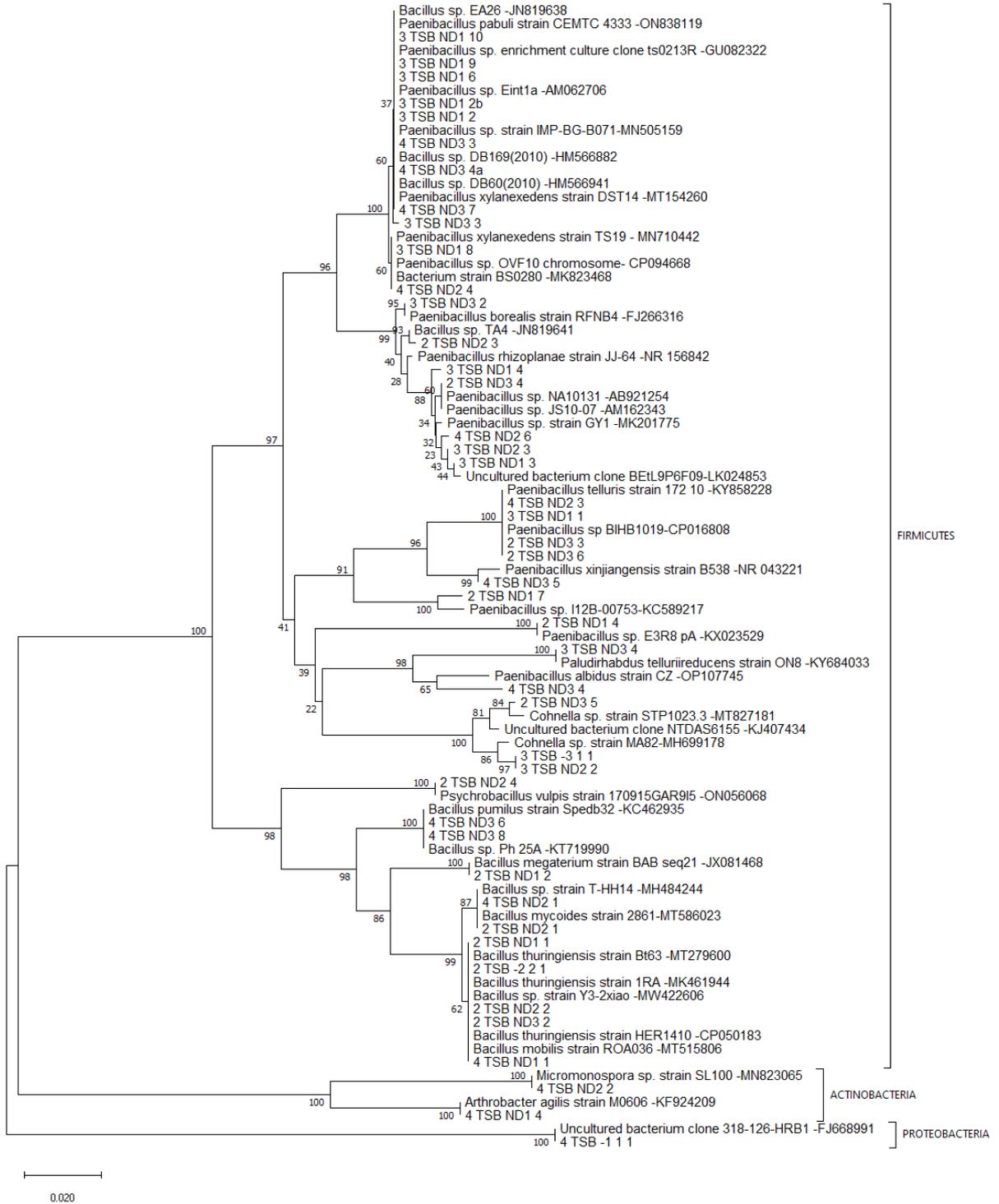


Figure 77 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche ZB à partir du milieu TSB

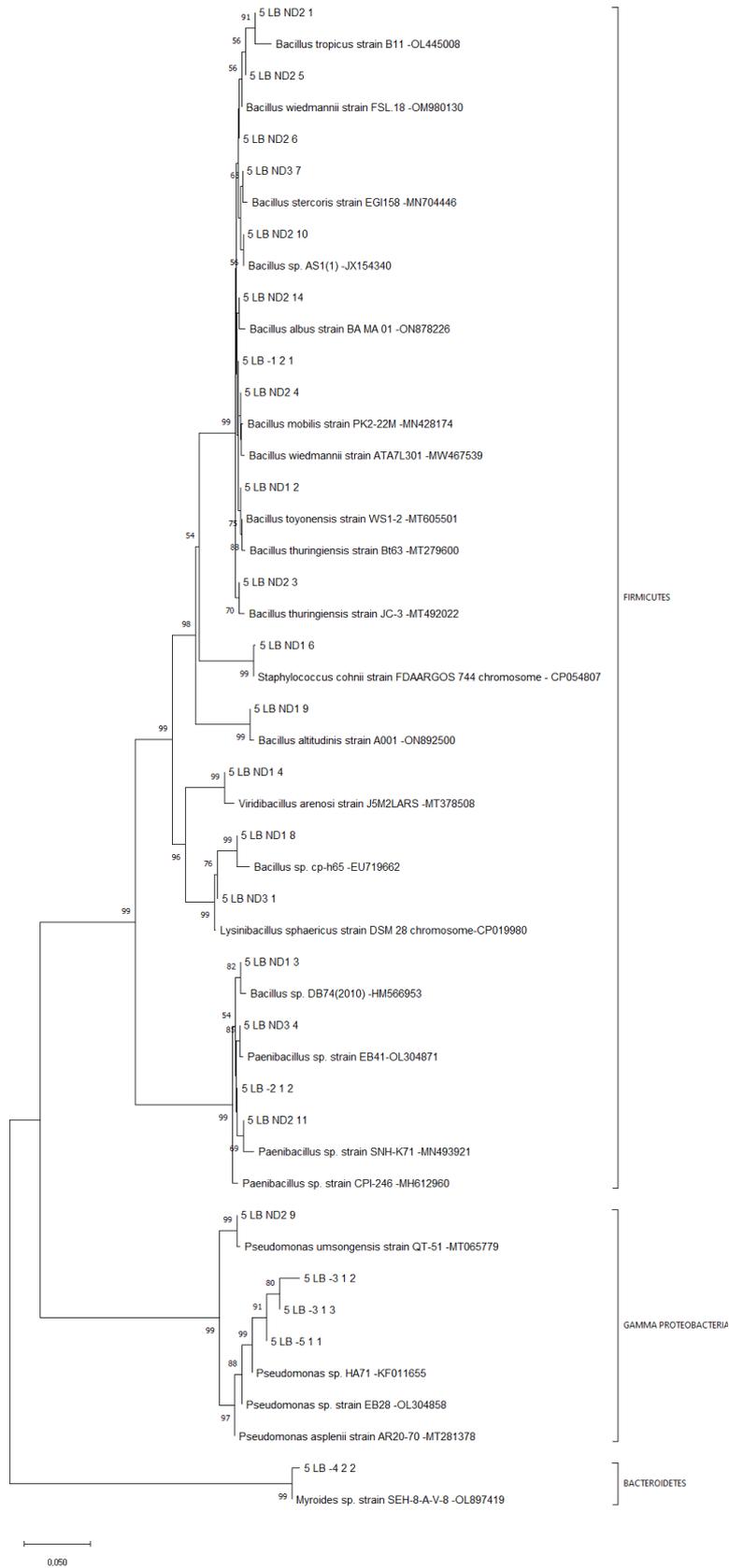


Figure 78 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche MH à partir du milieu LB

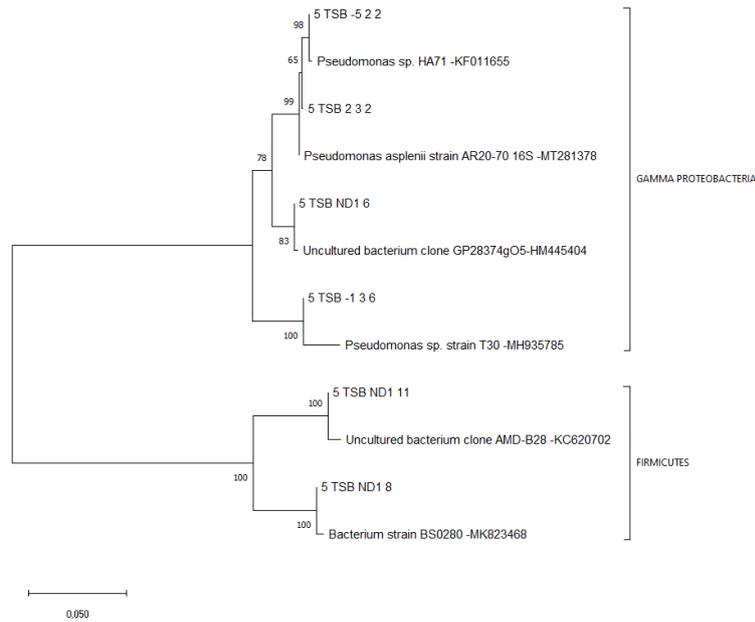


Figure 79 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la couche MH à partir du milieu TSB

2) Souches isolées potentiellement tolérantes aux radioéléments/métaux

Comme il a été fait pour les souches isolées dans les sources minérales radioactives, une étude bibliographique a permis d'identifier les souches bactériennes isolées qui sont associées à des espèces bactériennes connues pour leur capacité à tolérer ou interagir avec des métaux et/ou des radioéléments. Le Tableau 27 ci-dessous résume quelles souches bactériennes isolées dans cette carotte de sol, ont déjà été étudiées dans la littérature pour tolérer et/ou interagir avec des radioéléments/métaux.

Tableau 27 : Synthèse bibliographique des souches isolées de la carotte associées à des espèces bactériennes connues pour tolérer et/ou interagir avec des métaux et/ou des radioéléments

Label souche isolée	Souche affiliée (N°Accession)	Couche de sol	Tolérance et/ou interaction avec métaux/radioéléments	Auteurs
Actinobacteria				
4 TSB ND1 4	<i>Arthrobacter agilis</i> strain M0606 (KF924209)	Couche ZB	Des souches bactériennes apparentées à <i>Arthrobacter sp.</i> ont déjà été étudiées pour leur capacité à tolérer et interagir avec plusieurs éléments traces métalliques/radioéléments (dont l'uranium) via différents mécanismes (biosorption, bioaccumulation, bioréduction)	Benyehuda et al., 2003 ; Hanbo et al., 2004 ; Hlihor et al., 2017 ; Martinez et al., 2006 ; Nakajima et Tsuruta, 2004 ; Pathak et al., 2020 ; Suzuki et Banfield, 2004 ; Swer et al., 2016 ; Xiao et al., 2017
2 LB -5 1 1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> strain Cff1037 (CP041259)	Couche ZB	Des souches bactériennes appartenant à l'espèce <i>Curtobacterium sp.</i> ont démontré leur capacité à tolérer et interagir avec l'uranium, nickel et plomb : <ul style="list-style-type: none"> - <i>Curtobacterium sp. YU-SS-C-67</i> tolère la toxicité chimique de l'uranium et a la capacité de solubiliser le phosphate permettant la bioprécipitation - <i>Curtobacterium sp. FM01</i> est capable d'éliminer le nickel (II) et le plomb (II) par biosorption dans une solution aqueuse 	Masoumi et al., 2015 Sowmya et al., 2013
4 TSB ND2 2	<i>Micromonospora sp.</i> strain SL100 (MN823065)	Couche ZB	Le genre <i>Micromonospora</i> est tolérant à certains éléments traces métalliques (ETM) tels que l'arsenic et le cadmium. De plus, le genre <i>Micromonospora</i> a démontré un fort potentiel pour la phytoremédiation assistée par des bactéries dans des sites contaminés en ETM (production de métallophores).	Ali et al., 2012 Ortúzar et al., 2020 Zadel et al., 2020
Bacteroidetes				
5 LB -4 2 2	<i>Myroides sp.</i> strain SEH-8-A-V-8 (OL897419)	Couche MH	<i>Myroides Odoratimimus</i> était capable de produire des sidérophores permettant la chélation et l'extraction de l'uranium	Yajie et al., 2019
1 LB -1 3 1	<i>Myroides sp.</i> ZB35 (CP017769)	Couche MH		
Firmicutes				
1 LB ND3 1 1 LB ND3 10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SRCM 112835 (MT626036)	Couche MO	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> a démontré une forte résistance aux éléments traces métalliques et radioéléments. De plus, cette souche bactérienne possède une forte capacité de biosorption de l'uranium (VI) et du chrome (VI).	Liu et al., 2019 Ramachandran et al., 2022

1 LB ND3_3 2 LB ND1 1	<i>Bacillus cereus</i> strain 932875 (MT355407)	Couche MO Couche ZB	<i>Bacillus cereus</i> 12-2, isolée d'un site contaminé par le plomb et le zinc, a été étudiée pour sa capacité à biominéraliser l'uranium (VI). L'immobilisation de l'U(VI) par cette souche consistait tout d'abord en une adsorption à la surface des cellules, suivie d'un transport de l'uranium à l'intérieur des cellules et la formation enzymatique d'uramphite	Zhang et al., 2018
2 TSB ND1 2	<i>Bacillus megaterium</i> strain BAB_seq21 (JX081468)	Couche ZB	<i>Bacillus megaterium</i> pouvait adsorber l'uranium à sa surface cellulaire, et une modification de sa surface par l'application d'alginate de sodium pouvait améliorer la capacité d'adsorption de cette espèce bactérienne	Li et al., 2021 Tawfik et al., 2005
4 LB -1 2 1	<i>Bacillus Mojavensis</i> strain UCMB5075 (CP051464)	Couche ZB	La tolérance et la bioaccumulation de la souche bactérienne <i>Bacillus Mojavensis</i> ont déjà été démontrées dans une étude. Cette espèce bactérienne immobilisée et chargée sur des nanotubes de carbone a démontré sa capacité à biosorber l'uranium (VI).	Özdemir et al., 2016
2 TSB -2 2 1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain 1RA (MK461944)	Couche ZB	Des membres appartenant à <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BRC-ZYR3 et BRC-ZYR4 (isolées d'une mine d'uranium en Chine) et <i>Bacillus thuringiensis</i> O16) ont démontré une forte capacité à interagir avec l'uranium. Le processus d'immobilisation de l'uranium consistait en une biosorption extracellulaire suivi d'une biominéralisation intracellulaire.	Pan et al., 2015 Wei et al., 2019
2 TSB ND1 1 3 LB ND1 1 3 LB -1 2 1 5 LB ND2 2	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Bt63 (MT279600)	Couche ZB Couche MH		
2 TSB ND1 1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Bt63 (MT279600)	Couche ZB		
2 TSB ND3 2	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain HER1410 (CP050183)	Couche ZB		
5 LB ND1 7 5 LB ND2 3	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain JC-3 (MT492022)	Couche MH		
2 LB ND2 1	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain KF1 (CP085409)	Couche ZB		
5 LB ND1 2	<i>Bacillus toyonensis</i> strain WS1-2 (MT650501)	Couche MH		
3 LB -4 1 1	<i>Bacillus velezensis</i> strain T2 (ON791803)	Couche ZB	La souche bactérienne <i>Bacillus velezensis</i> strain UUS-1 a démontré un fort potentiel pour adsorber l'uranium dans l'eau de mer, grâce à des groupes amino et carboxyle présents dans les cellules bactériennes.	Yuan et al., 2019

5 LB ND3 1	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> strain DSM 28 (CP019980)	Couche MH	De nombreuses espèces de <i>Lysinibacillus sphaericus</i> ont démontré une forte tolérance aux métaux/radioéléments. <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-B53 et <i>Lysinibacillus sphaericus</i> JG-A12 (isolée du site d'extraction d'uranium de Haberland en Allemagne) ont été étudiées pour leur capacité à biosorber différents métaux et radioéléments (incluant de fortes concentrations en uranium) grâce à leur couche de surface (couche S).	Jankowski et al., 2010 Lozano et Dussán, 2013 Moll et al., 2020 Suhr et al., 2014 Williamson et al., 2021
2 LB -5 2 1 3 LB -5 2 1	<i>Oceanobacillus sojiae</i> strain NBRC 105379 (AB682253)	Couche ZB	<i>Oceanobacillus profundus</i> KBZ 3-2 pouvait éliminer de fortes concentrations en plomb et zinc par biosorption de ces éléments métalliques via des exopolysaccharides (EPS) produits par cette souche bactérienne	Mwandira et al., 2020
1 LB ND3 4	<i>Oceanobacillus</i> sp. 157B7_12 EMannit (KU644274)	Couche MO		
3 TSB ND3 2 3 LB ND2 1	<i>Paenibacillus borealis</i> strain RFN5 (FJ266316)	Couche ZB	Les cellules de <i>Paenibacillus</i> sp. JG-TB8 (étroitement apparentées à <i>Paenibacillus borealis</i>) complexe l'uranium (VI) via des groupes de phosphates organiques. De plus cette souche bioprécipitait l'uranium (VI) sous forme minérales de phosphate d'uranyle.	Reitz et al., 2014
3 TSB ND3 3	<i>Paenibacillus pabuli</i> strain CEMTC_4333 (ON838119)	Couche ZB	Une souche bactérienne de <i>Paenibacillus pabuli</i> a été étudiée pour son efficacité à éliminer le chrome hexavalent par biosorption	Rangasamy et al., 2020
2 TSB ND2 4	<i>Psychrobacillus vulpis</i> strain 170915GAR9I5 (ON056068)	Couche ZB	Une souche bactérienne associée au genre <i>Psychrobacillus</i> a déjà été isolée à partir d'échantillons provenant de l'ancienne mine d'uranium de Paukkajanvaara (Inde)	Lusa et al., 2019
5 LB ND1 6	<i>Staphylococcus cohnii</i> strain FDAARGOS (CP054807)	Couche MH	Une souche associée à <i>Staphylococcus cohnii</i> était résistante à de fortes concentrations de chrome, et avait la capacité de bioaccumuler le chrome (VI), ainsi que de le réduire sous forme chrome (III)	Saxena et al., 2000
(Alpha)Proteobacteria				
1 TSB_- 2_1_4	<i>Novosphingobium</i> sp. strain NRR1-PS-Eps7 (KX583511)	Couche MO	<i>Novosphingobium</i> sp. était impliquée dans la bioréduction de l'U(VI) et V(V) dans des aquifères souterrains co-contaminées par ces deux radioéléments	Chen et al., 2022
1 TSB -4 1 1 1 TSB -4 3 4	<i>Sphingomonas</i> sp. clone Pn1_1.1 (GQ181132)	Couche MO	<i>Sphingomonas</i> sp. a démontré un fort potentiel pour la biodégradation et la bioremédiation de sites contaminés en métaux et uranium.	Jaafar, 2019 Merroun et al., 2006
(Gamma)Proteobacteria				
1 LB -1 2 3	<i>Pseudomonas umsongensis</i> strain JM21 (MN758781)	Couche MO	<i>Pseudomonas umsongensis</i> CY-1 (isolée d'un site contaminé par de nombreux éléments traces métalliques) a démontré un fort potentiel pour la remédiation du chrome (VI) et du mercure (II) par bioréduction	Yao et al., 2020
1 LB -1 3 5	<i>Pseudomonas umsongensis</i> strain QT-51 (MT065779)	Couche MO		
1 LB -2 1 3		Couche MO		
5 LB ND2 7 5 LB ND2 9		Couche MH		

Annexe 4 : Arbres phylogénétiques des souches isolées dans les sources minérales

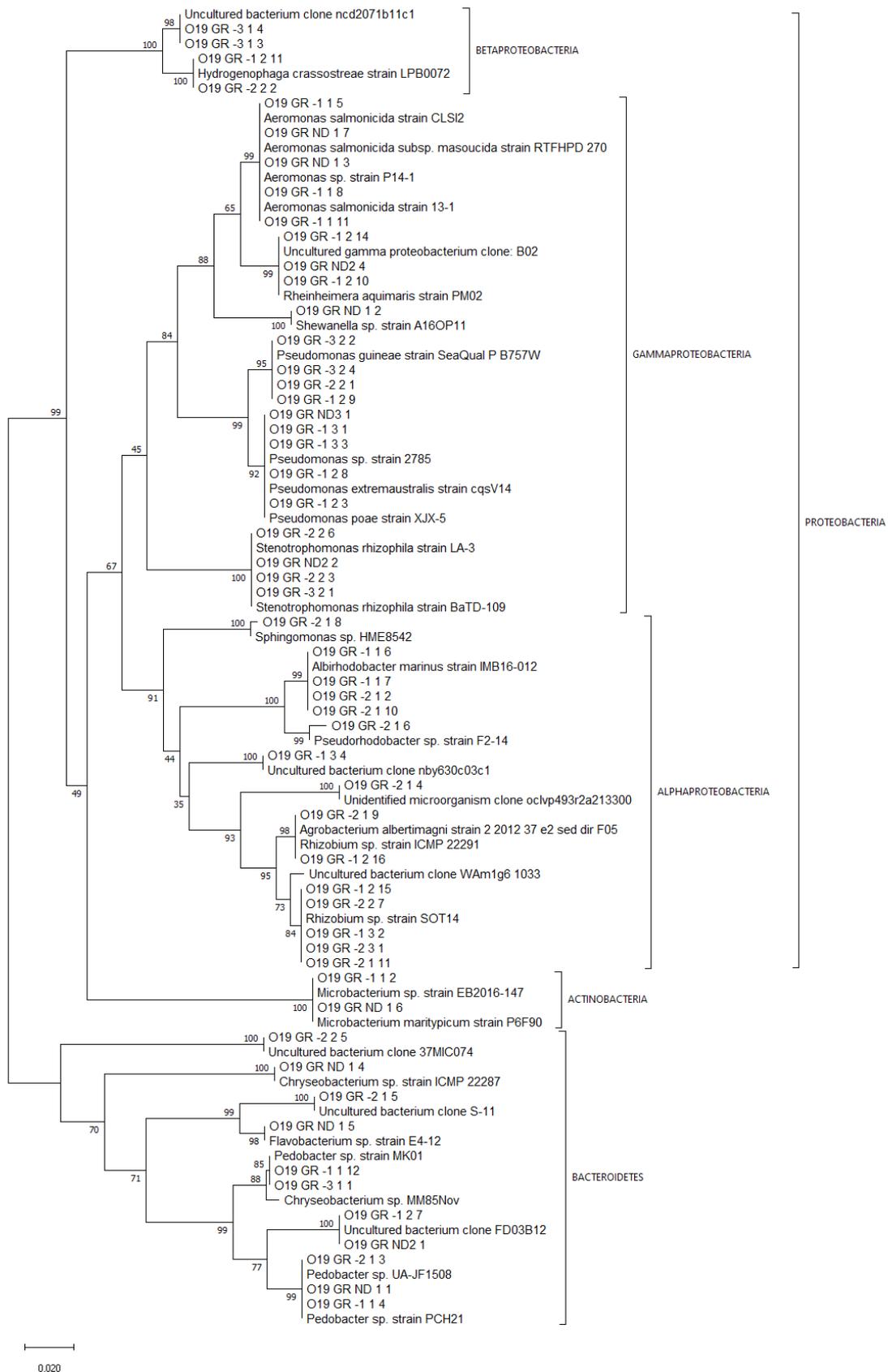


Figure 80 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Graviers

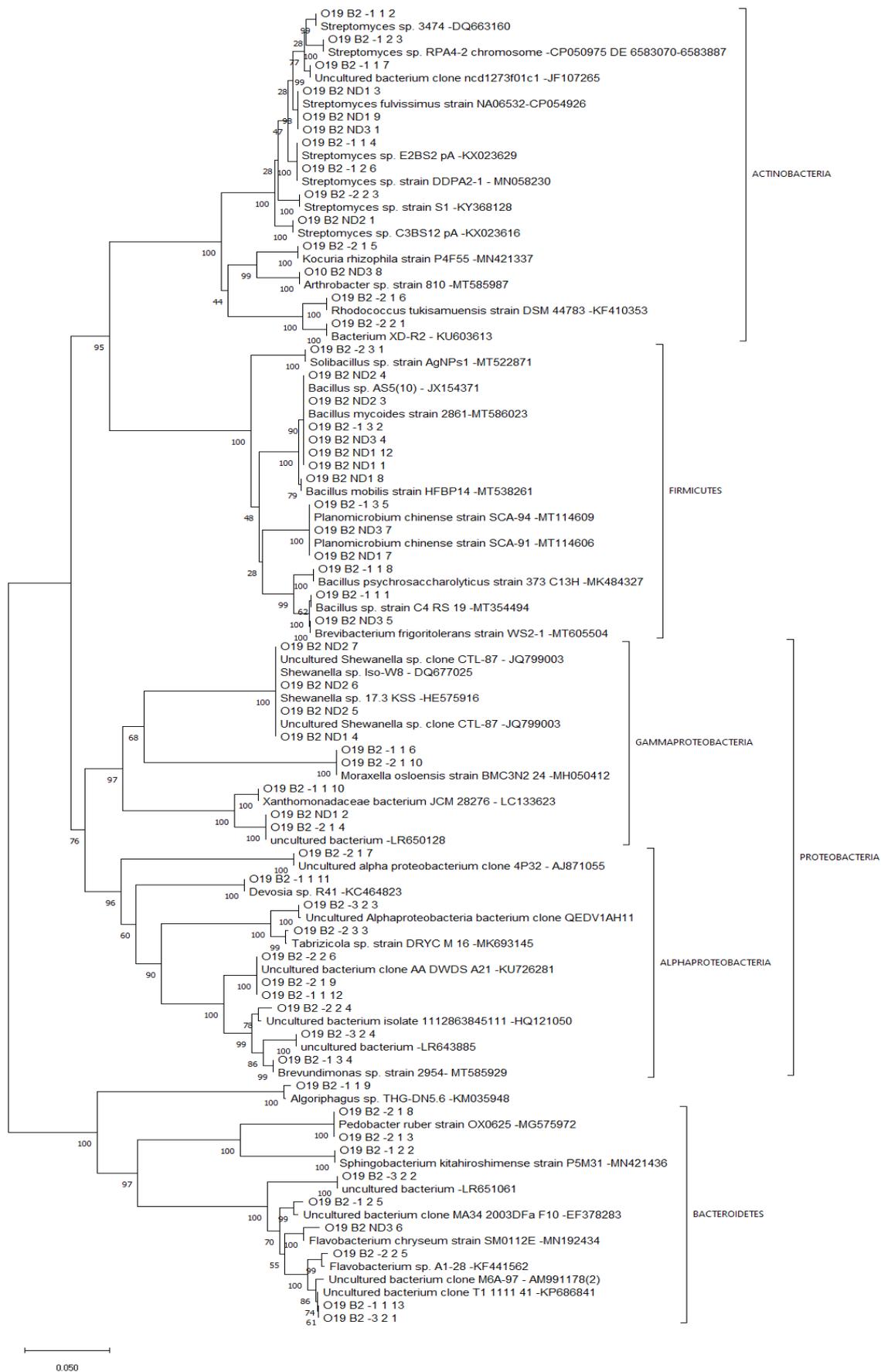


Figure 81 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Bard

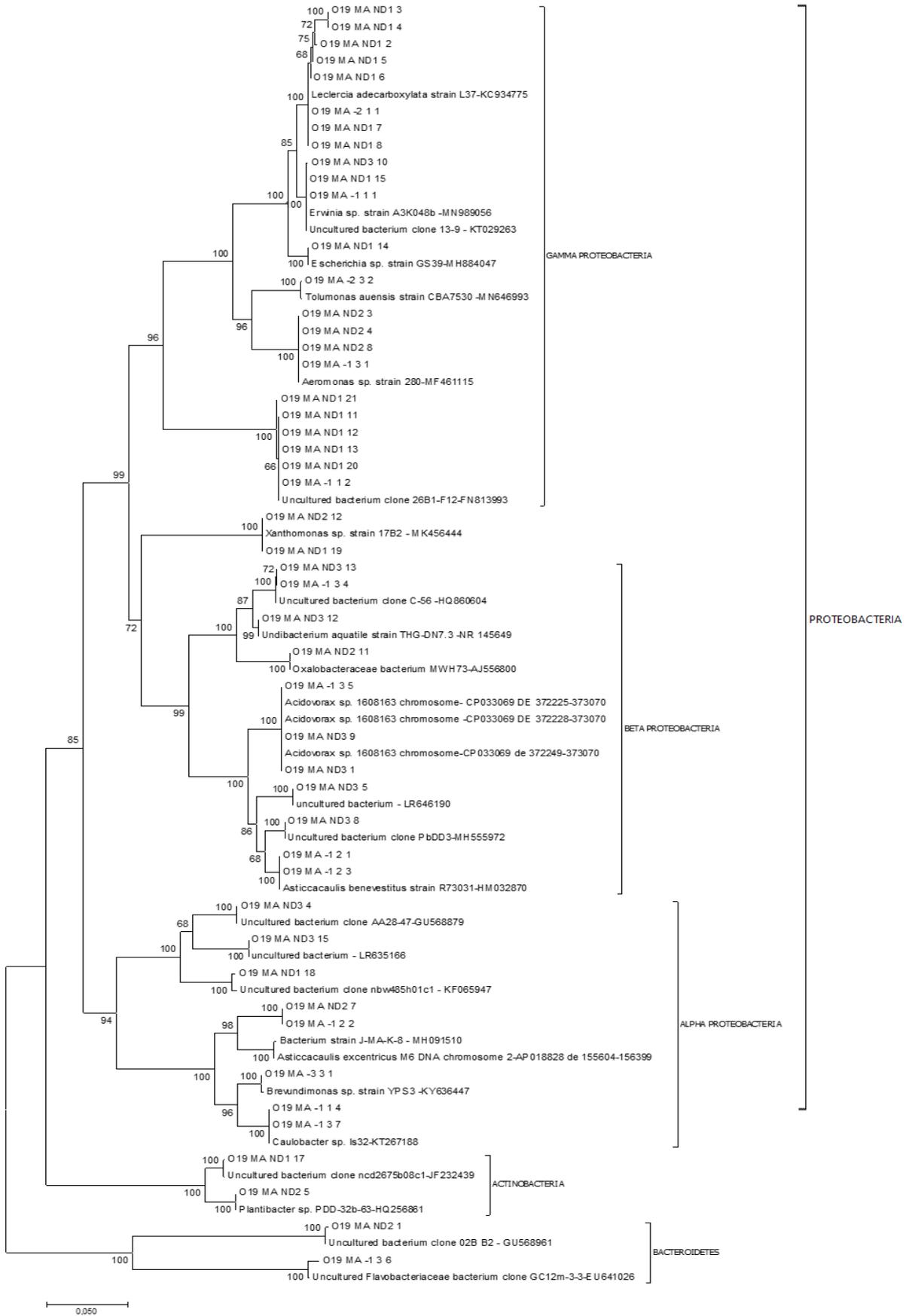


Figure 82 : Arbre phylogénétique des souches isolées de Mariol

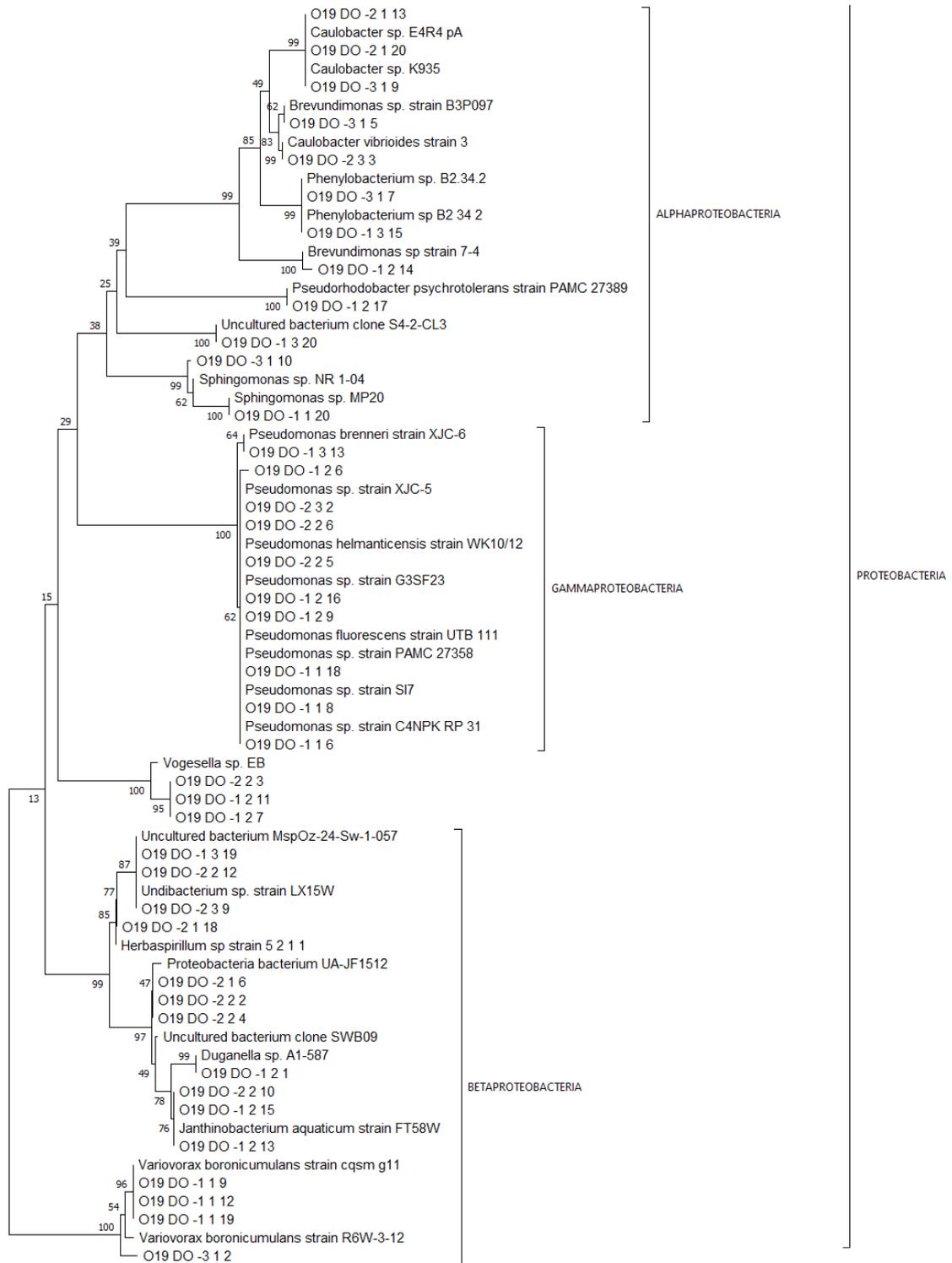


Figure 83 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Dourieux : Proteobacteria

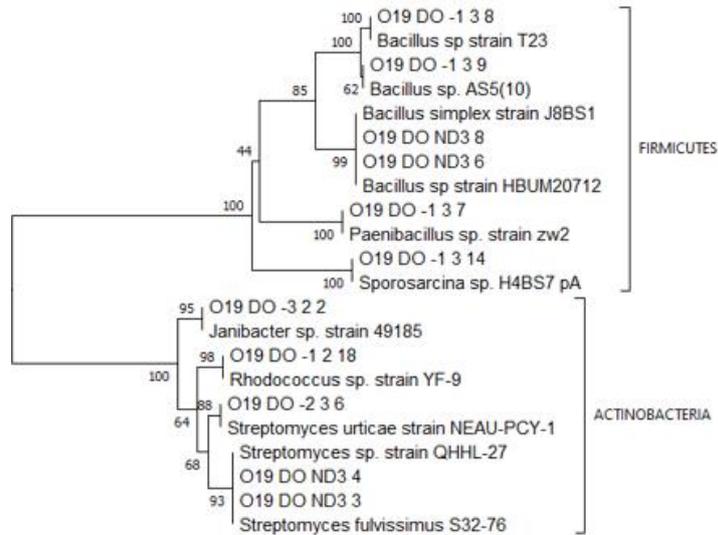


Figure 84 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Dourieux : Firmicutes et Actinobacteria

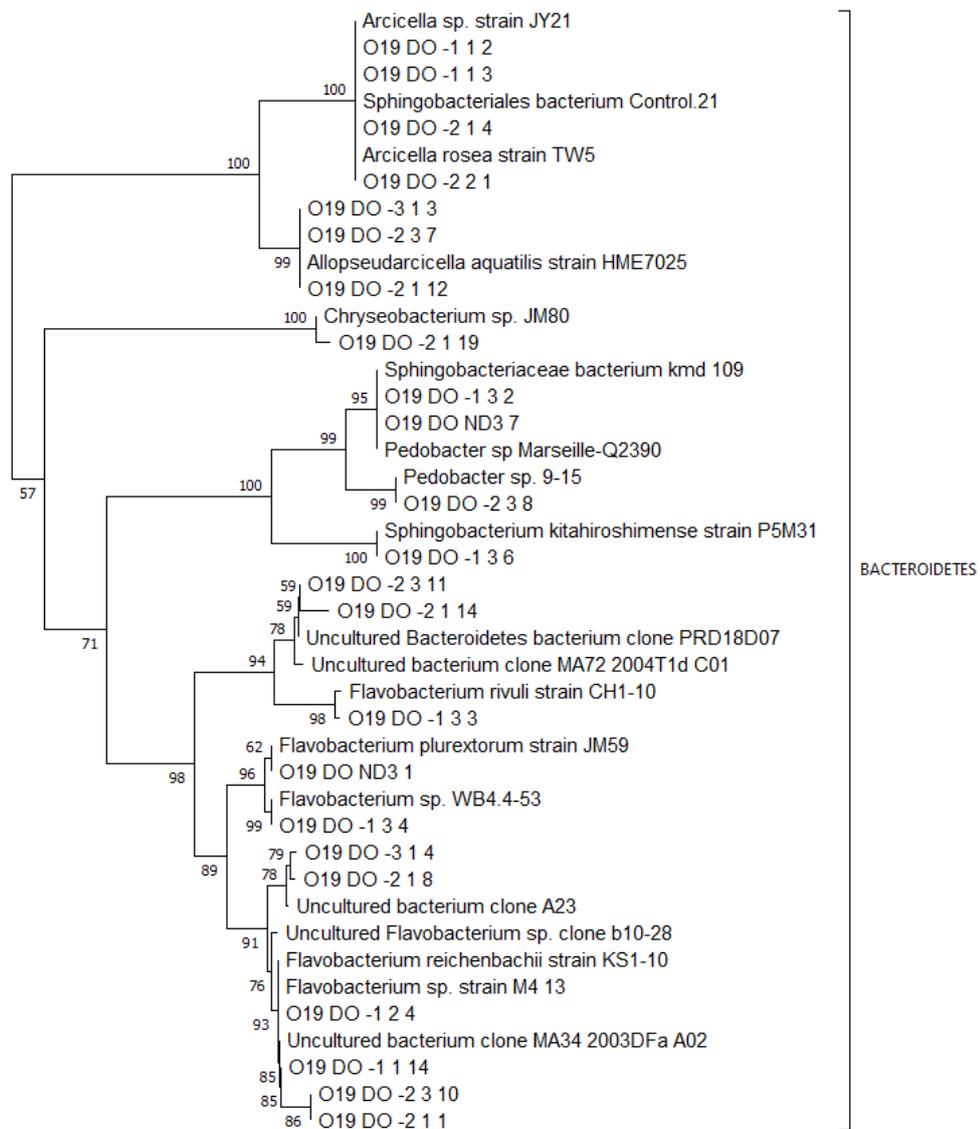


Figure 85 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Dourieux : Bacteroidetes

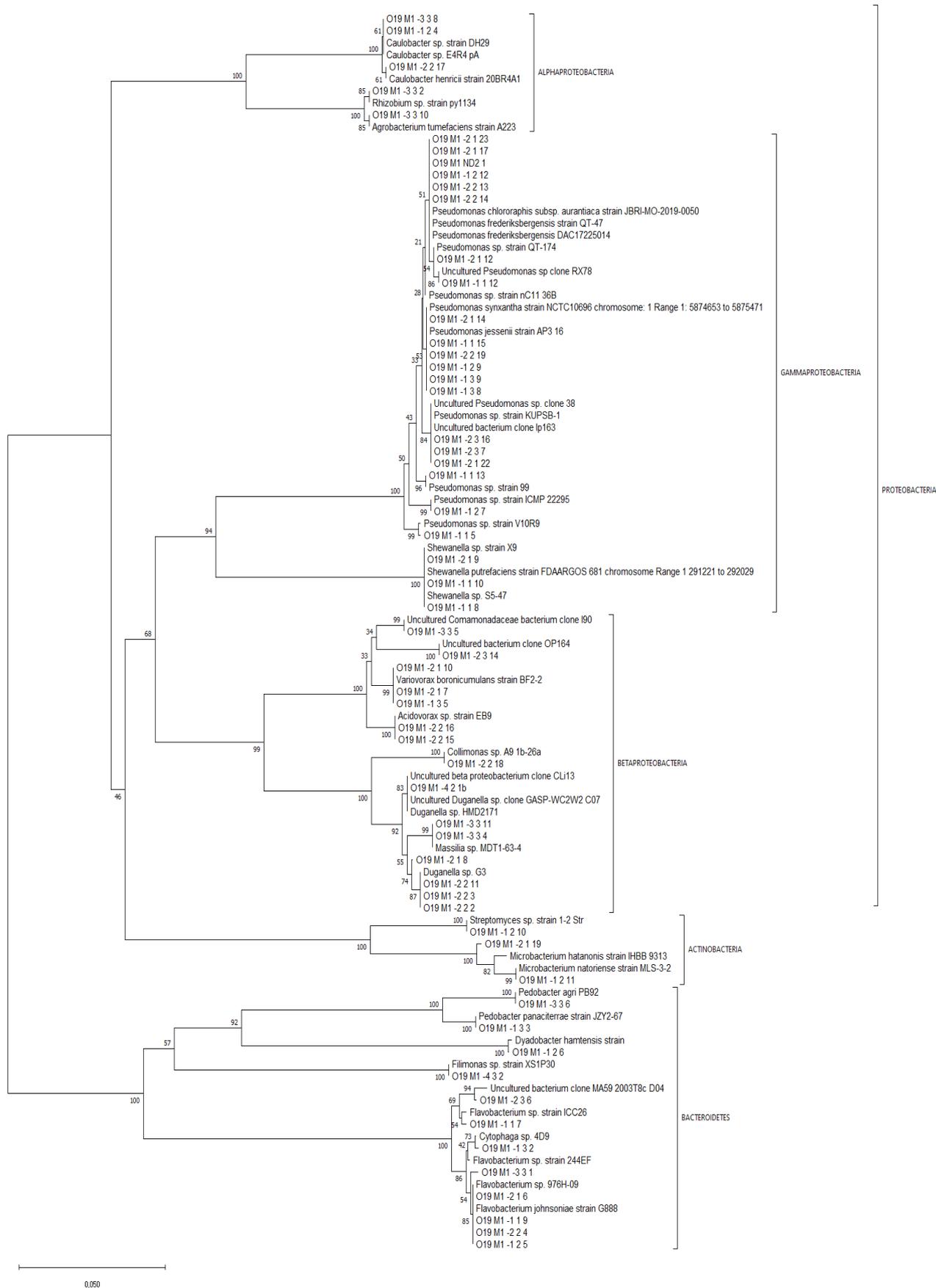


Figure 86 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Montagne

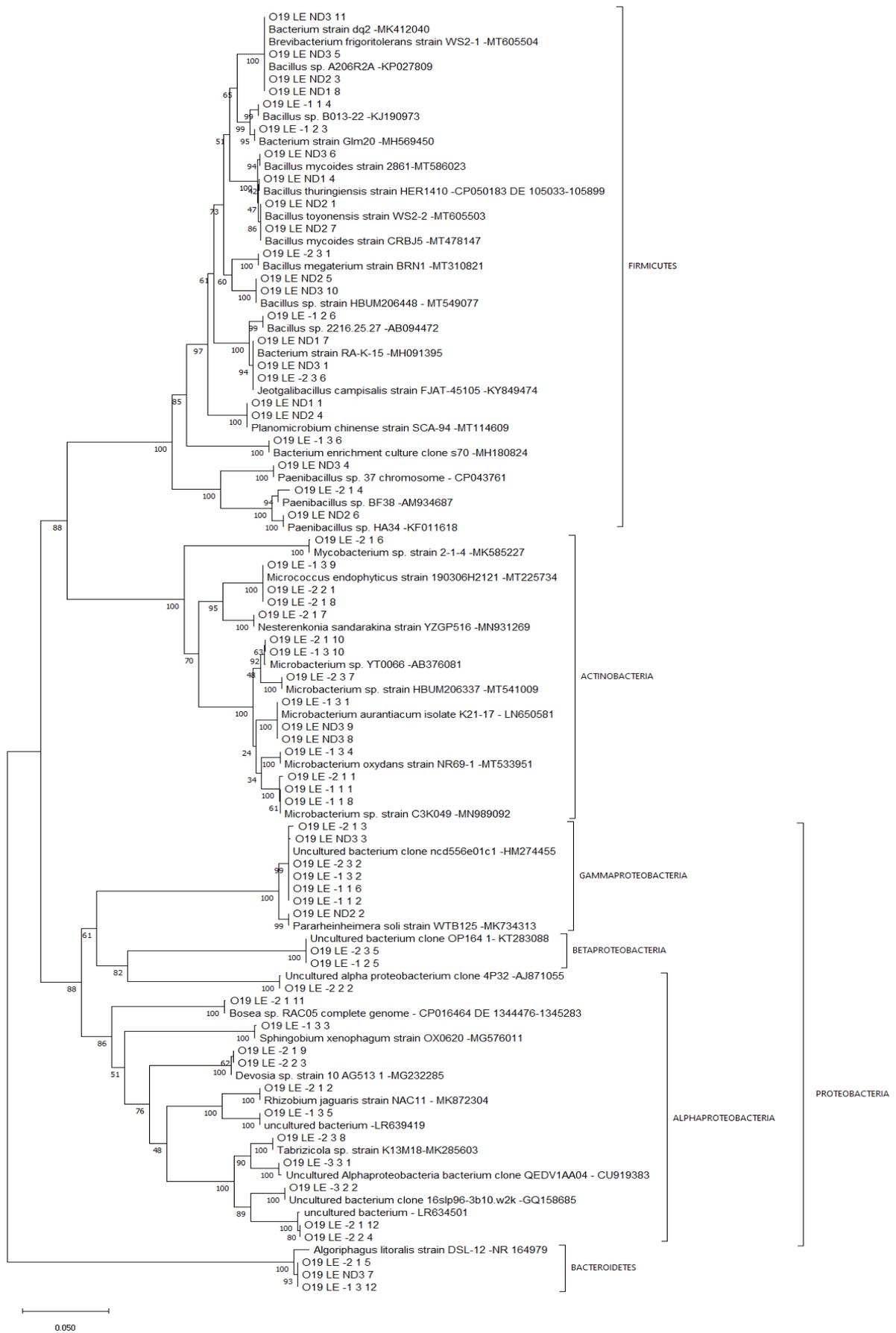


Figure 87 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de 3 Sautes

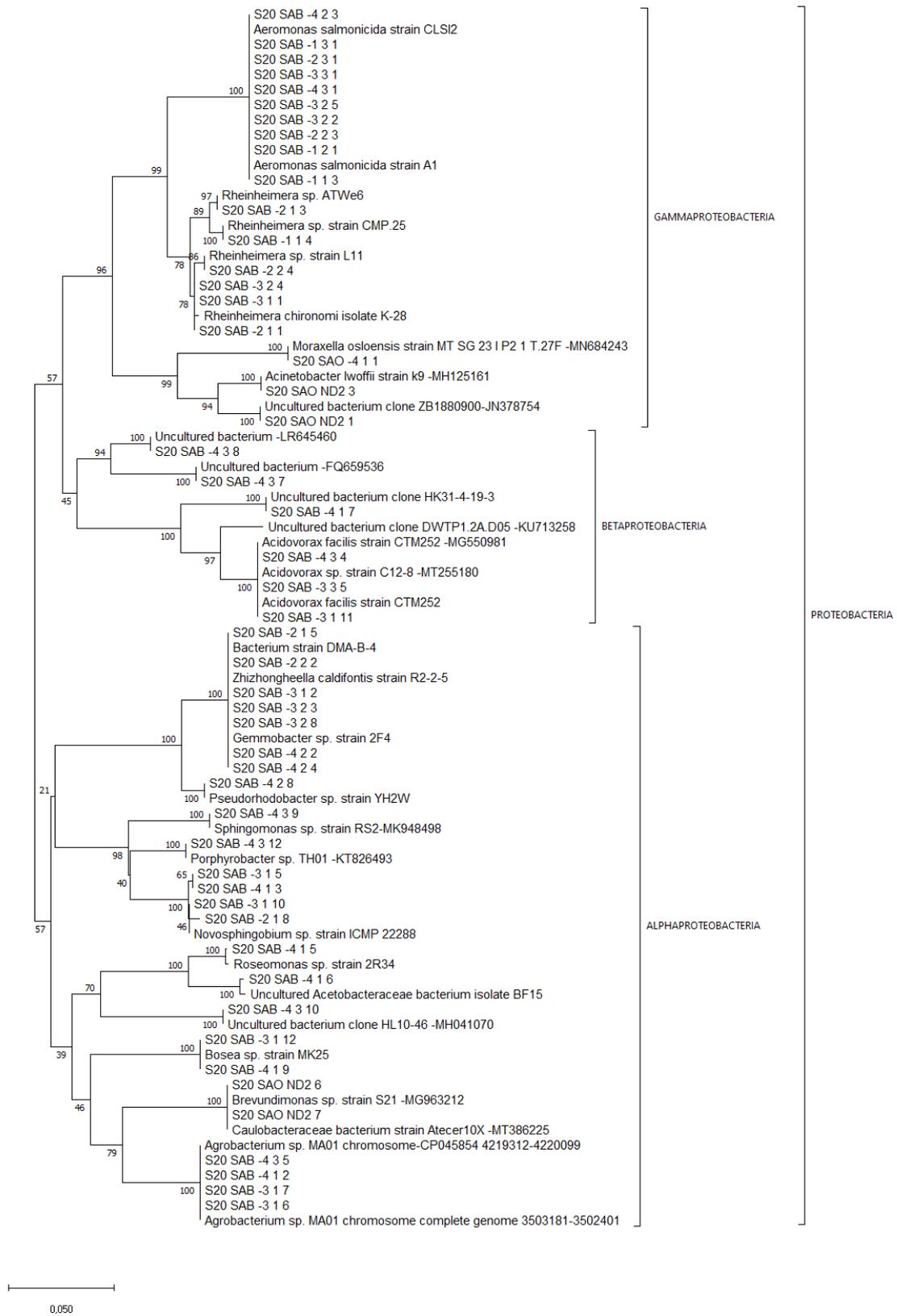


Figure 88 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Salins : Proteobacteria

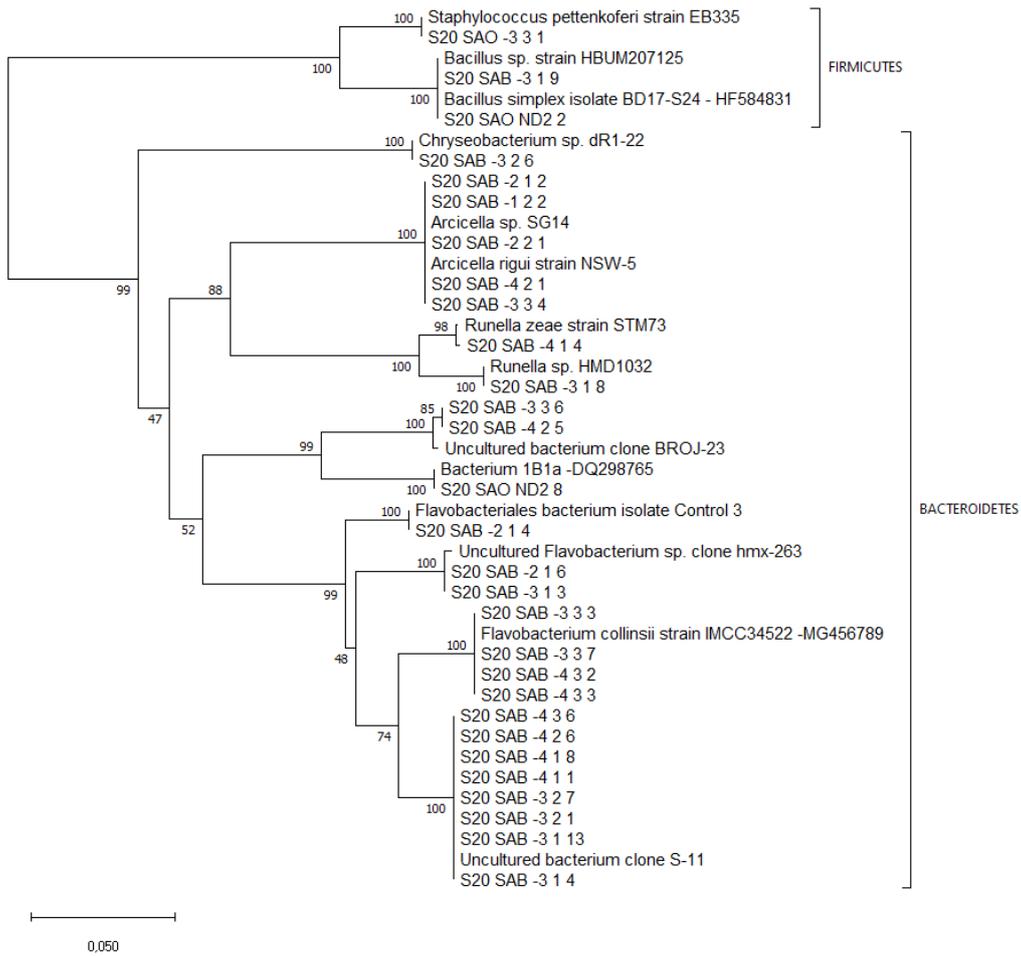


Figure 89 : Arbre phylogénétique des souches isolées dans la source de Salins : Firmicutes & Bacteroidetes

Communications scientifiques

Publications

- Holub G., Sergeant C., Vesvres M-H., Baker L-A., Kolovi S., Beauger A., Biron D., Chardon P., Maigne L., Mialler D., Michel H., Montavon G., Breton V., Mallet C. Bacterial communities in different natural radioactive mineral sources : how can the physico-chemical parameters structure these communities ? – en préparation pour Science of The Total Environment.
- Mallet C., Hassan-Loni Y., Holub G., Florent R., Thi-Hong-Hanh L., Champion J., Diez O., Michel H., Loiseau C., Sergeant C., Maubec N., Chardon P., Montavon G. Shift in microbial communities along little stream born from an old uranium mine drainage. – en préparation pour Science of The Total Environment.

Communications orales

- Holub G., Sergeant C., Vesvres M-H., Mallet C., Baker L-A., Kolovi S., Beauger A., Biron D., Chardon P., Maigne L., Mialler D., Michel H., Montavon G., Breton V. Impact de la radioactivité naturellement renforcée (NOR) sur les communautés microbiennes de sources minérales en Auvergne. 5^{ème} colloque des Zones Ateliers, 3 au 5 novembre 2020 (en visioconférence)
- Holub G., Sergeant C., Vesvres M-H., Mallet C., Baker L-A., Kolovi S., Beauger A., Biron D., Chardon P., Maigne L., Mialler D., Michel H., Montavon G., Breton V. Isolement de souches bactériennes potentiellement résistantes à l'uranium dans des sources minérales naturellement radioactives (Auvergne). GDR SciNEE – Atelier des doctorants, 11 et 12 mars 2021 (en visioconférence)
- Kolovi S., Fois G.R., Lanouar S., Chardon P., Miallier D., Rivrais G., Alain E., Baker L-A., Bailly C., Beauger A., Biron D., He Y., Holub G., Le Jeune A-H., Mallet C., Michel H., Montavon G., Schoefs B., Sergeant C., Maigne L., Breton V. : Radiation exposure of microorganisms living in radioactive mineral springs. ANPC 2021, Applied Nuclear Physics Conference, 12 au 17 septembre 2021, Prague, République Tchèque.

- Holub G., Sergeant C., Vesvres M-H., Baker L-A., Kolovi S., Beauger A., Biron D., Chardon P., Maigne L., Mialler D., Michel H., Montavon G., Breton V., Mallet C. Study of bacterial communities in several naturally radioactive mineral sources in Auvergne and their role in uranium biogeochemistry. First international webinar of young microbial ecotoxicology researchers (EcotoxicomicYR 2021), 22 novembre 2021 (en visioconférence)
- Beauger A., Baker L-A., Kolovi S., Holub G., Sergeant C., Mallet C., Voldoire O., Allain E., Colombet J., Breton V., Chardon P., Miallier D., Bailly C., Montavon G., Bouchez A., Rimet F., Chardon C., Wetzel C., Ector L., Biron D. : Biodiversité microbienne dans les sources minérales naturellement radioactives. Colloque CNRS Ecologie Environnement Biodiversité, 3 juin 2022, Clermont-Ferrand, France.
- Holub G., Sergeant C., Vesvres M-H., Baker L-A., Kolovi S., Beauger A., Biron D., Chardon P., Maigne L., Mialler D., Michel H., Montavon G., Breton V., Mallet C. Bacterial diversity characterization of naturally radioactive mineral springs: Role of these bacterial communities in uranium biogeochemistry. 10th International Conference on High Level Environmental Radiation Areas (ICHLERA 2022), 27 – 30 juin 2022, Strasbourg, France
- Kolovi S., Maigne L., Baker L-A., Beauger A., Biron D., Chardon P., Fois G.R., Holub G., Mallet C., Michel H., Montavon G., Breton V. : Radiation exposure of microorganisms living in radioactive mineral springs. 10th International Conference on High Level Environmental Radiation Areas (ICHLERA 2022), 27 – 30 juin 2022, Strasbourg, France
- Breton V., Allain E., Angia Sriram P-R., Bailly C., Baker L-A., Beauger A., Biron D., Busato E., Celle H., Chardon P., Colombet J., David K., Fois G.R., Gauthier P.J., He Y., Holub G., Kolovi S., Landesman C., Le Jeune A-H., Maigne L., Mallet C., Miallier D., Michel H., Montavon G., Peron O., Polleyre T., Schoefs B., Sergeant S., Vesvres M-H., Voldoire O. : Impact of radioactivity on microorganisms living in mineral springs. 10th International Conference on High Level Environmental Radiation Areas (ICHLERA 2022), 27 – 30 juin 2022, Strasbourg, France
- Holub G., Sergeant C., Vesvres M-H., Baker L-A., Kolovi S., Beauger A., Biron D., Chardon P., Maigne L., Mialler D., Michel H., Montavon G., Breton V., Mallet C. Influence de la radioactivité d'origine naturelle sur la structure de communautés bactériennes des sédiments de sources minérales. 2ème rencontre Rayonnement Radiochimie (R3C 2022), 31 août 2022, Nice, France
- Mallet C., Baker L-A., Beauger A., Billard H., Biron D., Breton V., Chardon V., Holub G., Le Jeune A-H. : Etude des interactions diatomées/bactéries attachées dans un environnement particulier représenté par les sources minérales naturellement radioactives. ADOLAF 2022, 40ème colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française, 13 au 15 septembre 2022, Clermont-Ferrand, France.

Communication par affiche

- Holub G., Sergeant C., Vesvres M-H., Mallet C., Baker L-A., Kolovi S., Beauger A., Biron D., Chardon P., Maigne L., Mialler D., Michel H., Montavon G., Breton V. Impact of natural radioactivity on microorganism communities in different mineral springs in Auvergne (Massif Central, France). 2nd international conference on microbial exotoxicology (Ecotoxicomic 2020), 2 au 6 octobre 2020 (en visioconférence)
- Holub G., Mallet C., Sergeant C., Vesvres M-H. Influence d'une contamination en uranium sur la structure et les fonctions de la communauté bactérienne du sol d'une zone humide, colloque NEEDS – Environnement et mécanismes de transferts des radionucléides, 23 au 25 mai 2022, Clermont-Ferrand, France

Les communautés bactériennes d'environnements radioactifs naturels et anthropisés : discrimination des facteurs environnementaux les structurant et caractérisation des mécanismes d'interaction d'isolats indigènes avec l'uranium

Résumé : L'étude des communautés bactériennes provenant de milieux enrichis ou contaminés en radionucléides permet de mieux comprendre l'effet de la radioactivité sur ces communautés. Les bactéries qui se développent dans ces environnements sont soumises à des pressions de sélection, résultant d'une adaptation à ces conditions extrêmes. En particulier, certaines bactéries interagissent avec les radioéléments selon divers mécanismes (biosorption, bioaccumulation, biominéralisation et bioréduction), entraînant dans certains cas une modification de la spéciation des radioéléments, les rendant moins mobiles, moins biodisponibles et donc moins toxiques. Les sources minérales naturellement radioactives constituent des écosystèmes intéressants pour comprendre comment les populations bactériennes de ces sources se sont adaptées à des niveaux élevés de radioactivité naturelle et chronique à très long terme. D'autre part, une contamination en uranium d'une zone humide située à l'aval d'un ancien site minier permettrait également d'observer si une exposition depuis un laps de temps plus court (dernières décennies) a entraîné une modification de la diversité bactérienne dans cet environnement. Les objectifs de cette thèse portaient sur la caractérisation des communautés bactériennes peuplant ces deux environnements, en complément des paramètres physicochimiques de ces sites d'études, afin de déterminer si les radionucléides, par rapport à d'autres paramètres environnementaux, sont des « drivers » de la composition des communautés bactériennes. Ces travaux ont permis de démontrer que des communautés bactériennes spécifiques étaient corrélées aux concentrations en radionucléides, dont l'uranium, dans ces deux environnements. Plusieurs de ces OTUs identifiées pourraient intervenir dans la biogéochimie des radionucléides, dont l'uranium, et présenteraient des fonctions similaires ou complémentaires leur permettant de se développer dans ces environnements extrêmes. En outre, la compréhension des mécanismes d'interaction mis en place par des isolats indigènes de ces deux sites, avec l'uranium, permettrait d'évaluer l'impact de ces bactéries sur la biodisponibilité de cet élément dans l'environnement. Deux souches apparentées à *Shewanella sp.* et *Serratia fonticola*, isolées de ces deux environnements, ont démontré la capacité à éliminer l'uranium en solution, la première principalement par biosorption, et la deuxième par biominéralisation de l'uranium grâce à la libération d'orthophosphate à partir d'une source de phosphate organique, médiée par son activité phosphatase. Enfin, des études exploratoires ont été réalisées en vue d'utiliser la souche apparentée à *Serratia fonticola* pour l'élimination d'uranium.

Mots-clés : Sources minérales radioactives, Ancien site minier d'uranium, Composition communautés bactériennes, Isolats bactériens, Interactions bactérie-uranium

Bacterial communities in natural and anthropised radioactive environments: discrimination of the environmental factors structuring them and characterisation of the interaction mechanisms of indigenous isolates with uranium

Abstract : The study of bacterial communities from environments enriched or contaminated with radionuclides provides a better understanding of the effect of radioactivity on these communities. Bacteria that develop in these environments are subject to selection pressures, resulting in an adaptation to these extreme conditions. In particular, some bacteria interact with radioelements through various mechanisms (biosorption, bioaccumulation, biomineralisation and bioreduction), leading in some cases to a modification of the speciation of radioelements, making them less mobile, less bioavailable and therefore less toxic. Naturally radioactive mineral sources are interesting ecosystems for understanding how bacterial populations in these sources have adapted to high levels of natural and chronic radioactivity over the very long term. On the other hand, uranium contamination of a wetland downstream of a former mining site would also allow us to observe whether exposure over a shorter period of time (last decades) has led to a change in bacterial diversity in this environment. The objectives of this PhD were to characterise the bacterial communities in these two environments, in addition to the physicochemical parameters of these study sites, in order to determine whether radionuclides, in contrast to other environmental parameters, are drivers of bacterial community composition. This work demonstrated that specific bacterial communities were correlated with radionuclide concentrations, including uranium, in these two environments. Several of the OTUs identified could be involved in the biogeochemistry of radionuclides, including uranium, and would have similar or complementary functions enabling them to develop in these extreme environments. In addition, understanding the mechanisms of interaction of indigenous isolates from these two sites with uranium would enable us to assess the impact of these bacteria on the bioavailability of this element in the environment. Two strains related to *Shewanella sp.* and *Serratia fonticola*, isolated from these two environments, demonstrated the ability to remove uranium in solution, the first mainly by biosorption, and the second by biomineralisation of uranium through the release of orthophosphate from an organic phosphate source, mediated by its phosphatase activity. Finally, exploratory studies were carried out with a view to using the *Serratia fonticola* related strain for uranium removal.

Keywords : Radioactive mineral springs, Old uranium mining site, Bacterial community composition, Bacterial isolates, Bacteria-uranium interactions

Unité de recherche

Université de Bordeaux, CNRS-IN2P3, LP2i Bordeaux, UMR 5797, 19 chemin du solarium 33170 Gradignan